

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

Pharmacologie

Présentée et soutenue par :

Chloé Rancoule

le : Vendredi 13 Septembre

Titre :

Obésité, fibrose du tissu adipeux, gluco-intolérance :
un nouveau médiateur lipidique impliqué, l'acide lysophosphatidique

Ecole doctorale :

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Unité de recherche :

I2MC équipe 3 Philippe VALET

Directeur(s) de Thèse :

Docteur Jean-Sébastien Saulnier Blache

Rapporteurs :

Professeur Karine Clément

Docteur Antoine Martinez

Membre(s) du jury :

Professeur Thierry Levade

Docteur Jean-Loup Bascands (membre invité)

Sommaire

Liste des abréviations:	6
Liste des schémas:	8
Obésité	12
I- L'obésité	14
II- L'obésité, un facteur de poids dans la mise en place de nombreuses pathologies	15
IV- Traiter l'obésité	16
IV- Modèles murins d'obésité	17
• Un modèle d'obésité nutritionnelle	17
• Un modèle d'obésité génétique	17
V- Conclusion.....	18
Trilogie Obésité/Insulino-résistance/Diabète	20
I- Indispensable insuline	22
I-1 Production et sécrétion d'insuline	22
I-2 Rôle métabolique de l'insuline	24
II- Insulino-résistance et diabète de type 2.....	26
II-1 De l'obésité à l'insulino-résistance	26
II-2 Le prédiabète	28
II-3 De l'insulino-résistance au diabète de type 2.....	29
III- Traitements du diabète de type 2	34
Physiopathologie du tissu adipeux de l'obèse	36
I- Physiologie du tissu adipeux	38
II- Expansion du tissu adipeux	41
III- Physiopathologie du TA de l'obèse.....	43
III-1 Flux d'acides gras libres.....	43
III-2 Hypoxie.....	43
III-3 Stress oxydant.....	44
III-4 Stress du réticulum endoplasmique.....	44

III-5 Inflammation	45
III-6 Remodelage matriciel et fibrose.....	47
• La matrice extra-cellulaire	47
• Généralités sur la fibrose	49
• La fibrose du tissu adipeux.....	50
• Causes possibles de la fibrose du tissu adipeux.....	53
• Conséquences de la fibrose du tissu adipeux	54
 <u>Le LPA, un médiateur lipidique</u>	<u>56</u>
I- Les médiateurs lipidiques.....	58
I-1 Lipides bioactifs ?	58
I-2 Médiateurs lipidiques, obésité et homéostasie métabolique	59
II- Le LPA, médiateur lipidique	61
II-1 Structure du LPA	61
II-2 Synthèse du LPA.....	61
• Synthèse du LPA intracellulaire.....	61
• Synthèse du LPA extracellulaire	61
II-3 Dégradation du LPA	67
• Les Lipides-Phosphates Phosphatases.....	68
• Les Epoxyde Hydrolases Solubles (sEH)	68
II-4 La signalisation du LPA	69
• Les récepteurs membranaires du LPA	69
• Récepteur intracellulaire	71
II-5 Pharmacologie du LPA.....	72
• Le Ki16425	72
• Le VPC12249	72
• L'AM966	73
• L'AM095	73
II-6 Effets physiologiques et physiopathologiques du LPA.....	73
• I-6-1 Prolifération, survie, migration, angiogenèse.....	73
• I-6-2 Cancers	74
• I-6-3 Inflammation.....	75
• I-6-4 Reproduction, développement	75
• I-6-5 Maladies neurologiques.....	76

• I-6-6 Développement osseux	77
• I-6-7 Maladies cardiovasculaires	77
• I-6-8 Processus de cicatrisation et de fibrose	78
III- LPA et tissu adipeux.....	81
III-1 Le tissu adipeux sécrète de l'ATX et produit du LPA.....	81
III-2 Le développement excessif du tissu adipeux peut réguler l'axe ATX/LPA	82
• ATX adipocytaire et obésité	82
• Mécanismes régulant l'ATX adipocytaire	82
III-3 Le LPA influence le développement du tissu adipeux.....	83
<u>Objectifs de la thèse</u>	<u>86</u>
Objectif partie 1	88
Objectif partie 2	89
Objectif partie 3	90
Objectif partie 4	90
<u>Résultats 1:ATX/LPA et obésité</u>	<u>92</u>
I- Contexte bibliographique et projet	94
II- Article 1	96
• Principales observations et commentaires.....	97
III- Protocole complémentaire 1.....	98
• Principales observations et commentaires.....	103
<u>Résultats 2: ATX/LPA et gluco-intolérance</u>	<u>108</u>
I- Contexte bibliographique et projet	108
II- Article 2	110
• Principales observations et commentaires.....	111
III- Protocole complémentaire 2.....	118
IV- Protocole complémentaire 3.....	119
<u>Résultats 3:ATX/LPA et fibrose associée à l'obésité</u>	<u>122</u>
I- Contexte bibliographique et projet	122
II- Article 5	124
• Principales observations et commentaires.....	125

III- Protocole complémentaire 4	128
Résultats 4: Etude clinique	132
Article 6	132
Principales observations et commentaires	134
Discussion générale	138
Annexes	146
I- Article 3	146
II- Article 4	147
Références bibliographiques	152

Liste des abréviations:

- AGL : acides gras libres
- AMM : autorisation de mise sur le marché
- AMPc : adénosine mono-phosphate cyclique
- Ap2 : protéine adipocytaire 2
- ARN : acide ribo-nucléique
- ATP : adénosine tri-phosphate
- ATX : autotaxine
- AUC : aire sous la courbe
- BAT : tissu adipeux brun
- CPE : carboxypeptidase
- CPT1 : carnitine palmitoyltransferase 1
- CTGF : facteur de croissance du tissu conjonctif
- DAG : diacyl-glycérol
- DMSO : diméthylsulfoxyde
- EAOs : espèces actives de l'oxygène
- FABP : protéine de liaison aux acides gras
- FAS : acides gras synthase
- F-ATX KO : souris invalidées pour le gène de l'autotaxine spécifiquement dans l'adipocyte
- FDA : administration des aliments et des médicaments
- GLUT : transporteur du glucose
- GMPc : guanosine mono-phosphate cyclique
- GPAT : glycérol-3-phosphat acyltransférase
- HFD : régime riche en gras
- HIF: facteur inductible par l'hypoxie
- HK2 : hexokinase 2
- HOMA-IR : évaluation homéostatique de l'insulino-résistance
- IL : interleukine
- IMC : indice de masse corporelle
- Ip : intra-péritonéale
- IRS : substrat du récepteur à l'insuline
- KO : invalidation
- LPA : acide lysophosphatidique
- LPA1à6 : récepteur 1 à 6 à l'acide lysophosphatidique
- LPC : lysophosphatidyl-choline
- LPL : lipo-protéine lipase
- LPP : phosphatase des lipides phosphates

- LT : leucotriène
- MCP1 : protéine 1 chémoattractante des monocytes
- Mes : tissu adipeux mésentérique
- MMP : métallo-protéinase matricielle
- OMS : organisation mondiale de la santé
- PA : acide phosphatidique
- PAF : facteur d'activation plaquettaire
- PAI : inhibiteur de l'activateur du plasminogène
- PBS : tampon phosphate salin
- PC : phosphatidyl-choline
- PC : tissu adipeux péricardique
- PE : phosphatidyl-éthanolamine
- PG (E, D, F, I....) : prostaglandines (de type E, D, F, I....)
- PG : tissu adipeux péri-gonadique
- PK : protéine kinase
- PL(A/D) : phospholipase (de type A ou D)
- PPAR : récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes
- PR : tissu adipeux péri-rénal
- RCPG : récepteur couplé aux protéines G
- ROCK : protéine kinase associée à Rho
- S1P : sphingosine 1 phosphate
- SC : tissu adipeux sous-cutané
- TG : triglycérides
- TGF : facteur de croissance transformant
- TIMP : inhibiteur tissulaire des métallo-protéinases
- TLR : récepteur de type Toll
- TNF : facteur de nécrose tumorale
- TRP : récepteur à potentiel transitoire
- TRPV : récepteur vanilloïde à potentiel transitoire
- UCP : protéine découplante
- VEGF : facteur de croissance de l'endothélium de croissance
- VMH : hypothalamus ventro-médian

Liste des schémas:

1. *Sécrétion de l'insuline par la cellule β après stimulation par le glucose* page 17
2. *Signalisation insulinaire et résistance à l'insuline* page 21
3. *Rôle de l'insuline sur le métabolisme glucidique lors d'une hyperglycémie dans différents statuts métaboliques* page 27
4. *Lipomobilisation dans l'adipocyte* page 31
5. *Inflammation du tissu adipeux obèse* page 39
6. *Mécanismes généraux de mise en place d'une fibrose* page 42
7. *Médiateurs lipidiques* page 49
8. *Médiateurs lipidiques et obésité* page 51
9. *Voies de synthèse du LPA* page 53
10. *Récepteurs au LPA* page 60
11. *Signalisation du LPA* page 62
12. *LPA et tissu adipeux* page 76
13. *Bilan et hypothèses* page 120

Résumé

L'acide lysophosphatidique (LPA) est un médiateur lipidique agissant via des récepteurs spécifiques (LPA1R) et produit par une lysophospholipase D sécrétée par différents tissus: l'autotaxine (ATX). Chez l'Homme comme chez la souris, l'expression de l'ATX dans le tissu adipeux est augmentée en situation d'obésité. Nos travaux ont mis en évidence que chez l'Homme, cette surexpression se retrouve uniquement dans les dépôts viscéraux tandis que chez la souris l'ATX est surexprimée à la fois dans les dépôts sous-cutanés et viscéraux, ce qui se traduit par une augmentation des taux de LPA plasmatiques. Nous avons également montré grâce à un modèle de souris invalidées pour le gène codant l'ATX dans l'adipocyte (F-ATX KO) que **l'augmentation de l'expression de l'ATX dans l'adipocyte est responsable de l'augmentation des taux plasmatiques de LPA en situation d'obésité.**

Nous avons ensuite mis en évidence, que sous régime obésogène, la masse adipeuse des souris F-ATX KO augmente de façon plus importante que celle des souris sauvages. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation d'un antagoniste pharmacologique des LPA1R et LPA3R, le Ki16425. L'ensemble des données obtenues par ces approches suggèrent que **l'axe ATX/LPA constitue un frein physiologique à l'expansion du tissu adipeux.**

De façon surprenante, chez les F-ATX KO comme chez les souris traitées au Ki16425, l'inhibition de l'axe ATX/LPA s'accompagne d'une amélioration de la tolérance au glucose. Le traitement au Ki16425 améliore également la tolérance à l'insuline, induit une augmentation du nombre des îlots pancréatiques et un meilleur stockage du glucose dans le muscle et le foie des animaux traités. A l'inverse, augmenter la signalisation LPA via l'injection aigue de LPA chez la souris induit une gluco-intolérance en bloquant la sécrétion d'insuline induite par le glucose, via un effet direct sur les îlots de Langerhans. Nos résultats montrent donc que **le LPA agit de manière délétère sur la prise en charge du glucose dans l'organisme.**

Dans la dernière partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la fibrose du tissu adipeux associée à l'obésité. Le LPA étant décrit comme un facteur pro-fibrosant au niveau de plusieurs autres organes, nous avons bloqué son action (Ki16425) chez des souris massivement obèses (*db/db*). Ce traitement réduit significativement la fibrose. L'effet pro-fibrosant du LPA est retrouvé au niveau d'explants de tissu adipeux humain et semble être dépendant de l'activation du facteur de transcription HIF1 α . Nos travaux suggèrent ainsi que **le LPA participe à la fibrose du tissu adipeux retrouvée en situation d'obésité.**

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse identifie le LPA comme une lipokine délétère et font donc de l'axe ATX/LPA une cible de choix pour le traitement de troubles associés à l'obésité tels que la fibrose du tissu adipeux et l'intolérance au glucose.

Abstract

Lysophosphatidic acid (LPA) is a lipid mediator acting via specific receptors (LPAR) and produced by autotaxin (ATX), a lysophospholipase D secreted by different tissues. In human being and in mouse, ATX expression in adipose tissue is increased in obesity. Our work shows that in human, this overexpression is found only in visceral fat deposits, while in mouse ATX is up-regulated in both subcutaneous and visceral fat deposits, and this is associated with an increase in the concentration of plasma LPA. We also show through a knockout mice model for the gene encoding the ATX in adipocytes (F-ATX KO) that the **increased expression of ATX in adipocytes is responsible for the increased plasma concentration of LPA in obesity.**

We then demonstrated that under an obesogenic diet, the fat mass of F-ATX knockout mice increases to a greater extent than in wild-type mice. These results were confirmed using a pharmacological treatment with a LPA1R and LPA3R antagonist, Ki16425. The data obtained by these approaches suggest that **ATX/LPA axis is a physiological barrier to adipose tissue expansion.**

Surprisingly, in F-ATX KO mice as in Ki16425-treated mice, the inhibition of the ATX/LPA axis is associated with an improved glucose tolerance. Ki16425 treatment also improves insulin tolerance, induces an increased number of the Langerhans islets and a better glucose storage in muscle and liver of treated animals. On the other hand, increasing the LPA signaling through the acute injection of LPA in mice induces glucose intolerance with a direct effect on Langerhans islets, blocking glucose-induced insulin secretion. Our results show that **LPA impairs glucose homeostasis.**

In the last part of this thesis, we focused on adipose tissue fibrosis associated with obesity. As LPA is described as a pro-fibrotic factor in several other organs, we blocked its action (Ki16425) in massively obese mice (*db/db*). This treatment significantly reduced adipose tissue fibrosis. The pro-fibrogenic effect of LPA was found in human adipose tissue explants and seems to be dependent on the activation of the transcription factor HIF1 α . Our studies thus suggest that **LPA is involved in obesity-associated adipose tissue.**

Altogether, the results obtained during this thesis identify LPA as a deleterious lipokine and reveal ATX/LPA axis as target for the treatment of obesity-associated disorders such as adipose tissue fibrosis and glucose intolerance.

Obésité

I- L'obésité

L'obésité est aujourd'hui l'une des préoccupations les plus urgentes des systèmes de santé. Elle représente une source majeure de morbidité, pouvant conduire à des handicaps et augmenter la prévalence de la mortalité avec une moins bonne qualité de vie et une espérance de vie plus courte que les personnes qui ont un poids normal [105, 106, 392].

La production de connaissances cliniques et fondamentales est donc indispensable pour freiner l'épidémie qui frappe les pays industrialisés comme le notre.

L'obésité est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme une accumulation excessive de masse grasse qui peut nuire à la santé. Elle est définie par différentes méthodes, la plus utilisée étant la mesure de l'indice de masse corporelle (IMC) qui détermine la «corpulence» de l'individu. $IMC = \text{Poids (kg)} / \text{Taille}^2 \text{ (m)}$. On considère un état obèse dès lors que cette valeur est supérieure ou égale à 30. Cependant, il faut rester prudent quant à cette mesure qui sert uniquement d'indication et ne correspond pas nécessairement à la quantité de masse grasseuse d'un individu. Pour évaluer les risques liés à l'excès de masse grasse, il faut tenir compte du tour de taille qui est un bon reflet d'un excès de graisses abdominales. Un tour de taille supérieur à 100 cm chez l'homme et à 88 cm chez la femme est associé à une obésité abdominale et à un risque pour la santé. Une autre alternative est la mesure de l'indice de masse grasseuse qui tient compte du taux de graisse et de muscle contenu dans le corps de l'individu. Cette mesure peut se faire par tomographie à densité (CT-scan) ou par imagerie à résonance magnétique (IRM).

L'OMS estime, aujourd'hui qu'au moins un adulte sur trois dans le monde souffre de surcharge pondérale et que près d'un sur 10 est obèse, avec des proportions bien plus inquiétantes encore pour les pays développés.

L'impact médical et économique de l'obésité de nos jours devient alarmant puisque l'obésité participe à l'apparition de nombreuses pathologies... Les coûts directs et indirects qu'engendre l'obésité sont aujourd'hui très importants pour le système de santé.

II- L'obésité, un facteur de poids dans la mise en place de nombreuses pathologies

Si dire que l'obésité est une maladie reste encore controversé, son caractère chronique et évolutif, ainsi que ses conséquences physiopathologiques et médico-économiques permettent de la considérer comme une véritable situation pathologique, une situation à risque. Elle conduit en effet à l'apparition de nombreuses pathologies et est le cinquième facteur de risque de décès au niveau mondial. Au moins 2,8 millions d'adultes en meurent chaque année. En effet, le surpoids et l'obésité sont responsables de 44% des diabètes, 23% des cardiopathies ischémiques et en fonction du type de cancer de 7% à 41%.

On peut lister ainsi un grand nombre de pathologies qui peuvent être induites par l'obésité.

On peut lister ainsi un grand nombre de pathologies qui peuvent être induites par l'obésité. Parmi elles le diabète de type 2 [123], avec 1 obèse sur 3 qui est diabétique (voir partie 2).

L'obésité est aussi responsable de désordres du sommeil [10], de douleurs ostéo-articulaires [331], de problèmes respiratoires [236], de problèmes de fertilité [150]. Mais l'obésité peut également être un facteur de risque pour le développement de certaines maladies neuro-dégénératives comme la maladie d'Alzheimer [306]. Elle peut également conduire à des dyslipidémies [163], et des problèmes hépatiques [77], peut entraîner une hypertension [26], des pathologies cardiaques et des troubles veineux [390].

C'est aussi un facteur de risque pour l'apparition de certains cancers avec une part variant entre 7% à 41% en fonction des cancers qui serait du à l'obésité ou au surpoids (OMS – Mai 2012), [71, 165, 394].

Enfin, l'obésité peut devenir un fardeau psychologique. Certaines personnes se sentiront exclues de la société en raison des critères de beauté proposés par l'industrie de la mode et par les médias. Devant la difficulté à perdre leur excès de poids, d'autres vivront une grande détresse ou de l'anxiété, qui pourra aller jusqu'à la dépression.

L'obésité nécessite donc un suivi médical régulier afin de détecter la survenue de ces pathologies associées.

IV- Traiter l'obésité

Selon les experts de la clinique Mayo aux États-Unis, une perte de poids correspondant à 5 % à 10 % du poids corporel permet d'améliorer la santé de façon notable (Fondation Mayo 2012).

La perte de poids peut passer par une modification de l'hygiène de vie. Ainsi, l'une des meilleures façons de prévenir ou de traiter l'obésité est de surveiller son alimentation. L'activité physique est aussi un élément essentiel pour maintenir un poids de santé.

Actuellement en France, un seul type de médicament a l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de l'obésité: l'Orlistat. Il est réservé aux personnes qui présentent une obésité ($\text{IMC} > 30 \text{ Kg/m}^2$) et des facteurs de risque importants de maladies cardiovasculaires, de diabète, d'hypertension, etc. Orlistat (Xenical®) a pour effet d'inhiber les enzymes qui interviennent dans la digestion des graisses (lipases intestinales) et empêche donc l'absorption des graisses dans le tube digestif. Il empêche ainsi l'absorption d'environ 30% des graisses alimentaires (triglycérides).

En 2008 et 2010, l'Agence européenne du médicament, retirait du marché le Rimonabant (Acomplia®) et la Sibutramine (Meridia®) suite à l'apparition d'effets secondaires graves.

Si l'obésité prend aujourd'hui des allures d'épidémie et mobilise de nombreux laboratoires et chercheurs, le bilan des thérapies médicamenteuses de l'obésité est peu reluisant : tous les médicaments promus dans les dernières décennies ont été qualifiés de percées majeures mais ont tous déçu en raison, principalement, de leurs effets secondaires [84]. Les médicaments actuels sont toujours sous surveillance. Mais la recherche de médicament anti-obésité est en plein essor et de nouveaux médicaments devraient donc voir le jour d'ici quelques années [313].

La chirurgie bariatrique permet également de traiter l'obésité [200] mais aussi ses complications [272]. Elle a le vent en poupe (20 000 interventions réalisées en France en 2009), mais la Haute Autorité de Santé (HAS) rappelle bien que le recours à la chirurgie doit rester une mesure exceptionnelle et uniquement dans le cas où l'obésité n'a pas pu être contrôlée par le traitement médical.

IV- Modèles murins d'obésité

Les modèles animaux ont permis des avancées majeures dans la compréhension des bases physiologiques, environnementales, génétiques de l'obésité et permettent ainsi le développement de nouveaux traitements.

L'obésité peut être de différents types : nutritionnelle, par lésion de l'hypothalamus, ou génétique (Obésité (2012) 7:18-25).

Lors de ma thèse j'ai utilisé deux modèles d'obésité :

- ***Un modèle d'obésité nutritionnelle***

Les régimes commerciaux comprennent 30%, 45% ou 60% de calories provenant des lipides, tandis que le régime contrôle iso-calorique contient seulement 10% de calories lipidiques. Bien que les rongeurs aient tendance, à terme, à réduire leur prise alimentaire sous régime gras, ils ingèrent plus de calories provenant des lipides ce qui conduit à une adiposité accrue et finalement à l'obésité.

- ***Un modèle d'obésité génétique***

Les souris *db/db* présentent une mutation du récepteur à la leptine ce qui conduit à une inefficacité de cette dernière (bien que les animaux développent une hyper-leptinémie) [64]. Les souris sont alors hyperphages, hyper-grasses et infertiles. Les animaux sont visuellement obèses dès le sevrage, démontrant une obésité très précoce (par comparaison à certains autres modèles). Elles peuvent finir par peser plus de 100 grammes, ce qui représente quatre fois le poids de leurs congénères non mutés. Ils sont aussi hyper-insulinémiques. La leptine est produite par les adipocytes, elle exerce ses effets endocrines de contrôle du poids en intervenant à distance sur certaines populations cellulaires de l'hypothalamus, à qui elle apporte des informations sur l'état des réserves adipeuses. Elle freine la prise alimentaire et augmente la dépense énergétique.

V- Conclusion

Au vue de la pandémie d'obésité et des différents problèmes de santé qu'elle engendre il est, à notre époque, primordial de développer la recherche sur l'obésité. Dans la mesure où l'obésité est une maladie plurifactorielle (alimentation, activité physique, facteurs environnementaux, économiques, socioculturels, prédisposition génétique), l'objectif est d'engager des programmes de recherche sur les interactions entre sciences humaines et sociales, la biologie fondamentale et la biologie appliquée, la pharmacologie, la pratique clinique et la santé publique.

L'obésité est avant toute chose une pathologie du tissu adipeux. Les chercheurs, notamment ceux de mon équipe, s'intéressent actuellement aux facteurs biologiques qui conduisent aux anomalies des cellules graisseuses, ainsi qu'à leur développement pathologique. Les avancées dans ce domaine sont très importantes. Le tissu adipeux, qui se développe de façon excessive en situation d'obésité, fut longtemps considéré comme un simple tissu de stockage. Il est aujourd'hui décrit comme un organe particulier et est placé au centre d'un tout nouveau schéma métabolique. Il s'est avéré que ce tissu avait une étonnante capacité à sécréter des substances participant à la mise en place de l'obésité et à certaines complications telles que les anomalies hépatiques, cardiaques, respiratoires ou articulaires. Ce sécrétome adipocytaire peut en effet avoir un effet sur le tissu adipeux lui-même mais avoir une action systémique, sur d'autres tissus et impacter ainsi à la mise en place de l'obésité et des pathologies associées [289].

C'est dans ce cadre que ma thèse s'est développée ;

Elle décrit l'implication d'un médiateur lipidique, l'acide lysophosphatidique (partie 4)

- premièrement dans le développement du tissu adipeux (partie 3) en situation d'obésité (partie 1),
- mais aussi dans l'apparition de certains troubles associés (parties 2 et 3).

Trilogie Obésité / Insulino-résistance / Diabète

I- Indispensable insuline

Le maintien de l'homéostasie glucidique est primordial au bon fonctionnement de l'organisme. Il est assuré par différents signaux qui peuvent être de type endocrinien, métabolique ou nerveux.

Parmi les signaux endocriniens, à jeun, le glucagon, les glucocorticoïdes, les catécholamines ou l'hormone de croissance ont une action hyperglycémiante, c'est-à-dire qu'ils vont permettre d'augmenter les taux de glucose dans le sang pour garder une glycémie (taux de glucose sanguin) constante. A l'inverse, lors d'une prise alimentaire, le glucose est absorbé par le tractus digestif et crée une hyperglycémie. L'insuline est la principale hormone impliquée dans le retour à une glycémie normale. Elle joue un rôle vital dans le maintien de l'homéostasie glucidique en exerçant son rôle d'hormone hypoglycémiante.

I-1 Production et sécrétion d'insuline

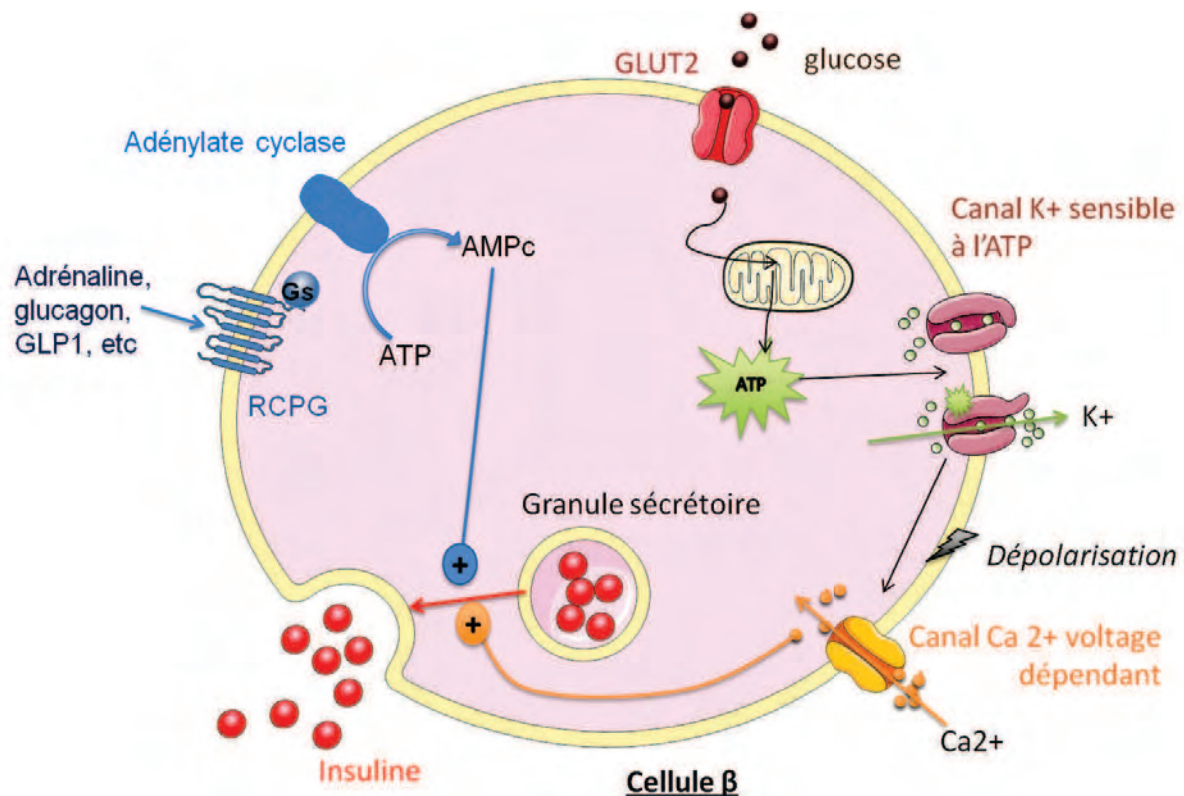
La production d'insuline est réalisée majoritairement dans les cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques. Ces cellules représentent seulement 1 à 2% du parenchyme pancréatique. Les îlots sont richement vascularisés; ils reçoivent 10-15% de la totalité du sang du pancréas.

L'insuline est transitoirement « stockée » au sein des cellules β dans des granules contenant de l'insuline stable plusieurs jours et qui sera libérée en réponse à une stimulation métabolique. L'insuline, à l'état basal, est sécrétée selon un mode pulsatile (fonction pacemaker du pancréas). Ce mécanisme a été mis en évidence notamment dans le modèle du pancréas isolé perfusé [345] ou dans les îlots de Langerhans isolés [128]. Ce caractère pulsatile aurait une importance physiologique car cela améliorerait la réponse à l'insuline, notamment en évitant la diminution du nombre de récepteurs à l'insuline [133] et le développement d'une insulino-résistance [293].

Seul le glucose peut exercer, à lui seul, une stimulation de la sécrétion d'insuline. Le mannose, la leucine et le glycéraldéhyde ont montré leur effet *in vitro* à des concentrations bien supérieures à leurs concentrations physiologiques. Certains agents sont par ailleurs capables de diminuer l'intensité de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose: on retrouve par exemple la noradrénaline, libérée par les terminaisons nerveuses sympathiques de l'îlot de Langerhans ou certaines hormones, comme la somatostatine.

Lorsque la glycémie augmente, le glucose pénètre dans la cellule par l'intermédiaire d'un transporteur spécifique (GLUT) dont les isoformes peuvent être différents en fonction des espèces (1 chez l'Homme et 2 chez le rongeur) [80]. Une fois dans la cellule, le glucose entre dans la voie principale de la métabolisation du glucose: la glycolyse. Le glucose est transformé en pyruvate et entre alors dans la mitochondrie où il intègre le cycle de Krebs pour y être oxydé, permettre la production d'équivalents réducteurs (NADH et FADH₂) et la synthèse d'ATP. L'augmentation des taux d'ATP entraîne la fermeture des canaux K⁺/ATP et induit une dépolarisation à la membrane plasmique [6]. Si la dépolarisation induite par la fermeture des canaux K⁺/ATP est suffisante, les canaux calciques dépendants du voltage sont activés (ouverts) et permettent une entrée massive de calcium dans la cellule [219]. En réponse à cette augmentation de calcium intracellulaire, les granules d'insuline fusionnent avec la membrane plasmique, *via* un processus dépendant du complexe NSF/SNAP/SNARE (respectivement *N-ethylmaleimide-Sensitive Fusion protein*, *Soluble NSF Attachment Protein*, *SNAP Receptors*) ce qui conduit à une exocytose rapide qui intervient 5 à 10 minutes après la stimulation.

Schéma 1 : Sécrétion de l'insuline par la cellule β après stimulation par le glucose



Certaines hormones et neuromédiateurs peuvent augmenter la sécrétion d'insuline sans faire varier les taux intra cellulaires de calcium [17]. C'est le cas notamment de l'adrénaline, du glucagon ou du GLP1, qui en se fixant sur le récepteur couplé à la protéine Gs vont stimuler la production d'AMPc par l'adénylate cyclase ce qui va conduire in fine à libération des granules sécrétoires d'insuline, notamment par l'activation de la protéine kinase A [17].

I-2 Rôle métabolique de l'insuline

L'insuline est essentiellement connue pour son action hypoglycémiante mais cette hormone possède en fait un rôle plus large. Elle est capable d'agir sur le métabolisme glucidique, lipidique et protidique (avec une action toujours anabolique) au niveau de ses tissus cibles que sont le foie, les muscles squelettiques et le tissu adipeux. Mais l'insuline agit aussi au niveau de bien d'autres types cellulaires en régulant la prolifération, la synthèse d'ADN, l'apoptose, etc... Elle va également agir au niveau central.

L'insuline exerce son action par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire à tyrosine kinase. Une fois activé, le récepteur de l'insuline phosphoryle plusieurs substrats (*Insulin Receptor Substrate*: IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4) sur des résidus tyrosine. Les IRS recrutent alors d'autres protéines et activent différentes voies de signalisation. Parmi elles, deux voies principales peuvent être distinguées :

- la voie de la PI-3 kinase (phosphatidylinositol-3 kinase) qui joue un rôle essentiel dans les actions métaboliques de l'insuline et dans le transport d'ions,
- la voie des MAPK qui est essentiellement impliquée dans la différenciation et la prolifération cellulaire.

Au niveau du métabolisme glucidique, son action hypoglycémiante fait intervenir plusieurs mécanismes :

- elle augmente l'entrée du glucose au niveau cellulaire en stimulant la translocation de son transporteur (GLUT 4) à la membrane plasmique,
- elle stimule le stockage du glucose sous forme de glycogène (glycogénogénèse) en activant la glycogène-synthase dans le foie et les muscles squelettiques et en augmentant la lipogénèse dans le foie, les muscles et le tissu adipeux,
- elle diminue la glycogénolyse hépatique en inhibant l'activité de la glycogène-phosphorylase,

- elle inhibe la néoglucogenèse (formation de glucose par le foie à partir de résidus non glucidiques comme les acides aminés ou le glycérol). Cette action se fait à deux niveaux. D'une part, l'insuline diminue la production d'acides aminés et d'acides gras à partir des stocks énergétiques et d'autre part elle inhibe l'activité des enzymes hépatiques de la néoglucogenèse.

L'insuline a aussi une action sur le métabolisme lipidique :

- elle agit sur le stockage des acides gras en activant la lipogenèse et en stimulant l'expression des enzymes de synthèse de lipides,
- elle inhibe la voie de dégradation des triglycérides (lipolyse)
- elle augmente, dans les adipocytes, la captation des acides gras libres plasmatiques en contrôlant la sécrétion de la lipoprotéine lipase, qui active dans le sang la dégradation des triglycérides en acides gras et en glycérol [322].

Enfin l'insuline module le métabolisme des acides aminés:

- elle augmente la captation intracellulaire des acides aminés et la synthèse protéique en stimulant la transcription et la traduction [307],
- elle inhibe la protéolyse.

II- Insulino-résistance et diabète de type 2

Parmi les pathologies induites par l'obésité on retrouve le diabète de type 2 [123]. L'accumulation de masse grasse, surtout lorsqu'elle est abdominale, est un puissant facteur prédisposant au diabète de type 2. Près de 80% des individus souffrant de diabète de type 2 sont obèses. En 2012, une revue décrit le tsunami du diabète [123].

Ce diabète est diagnostiqué, comme le diabète de type 1, par une glycémie à jeun supérieure à 1.26g/l (à deux reprises) ou par une glycémie mesurée 2 heures après l'ingestion de 75 g de sucre supérieure à 2 g/l.

II-1 De l'obésité à l'insulino-résistance

L'insuline est la seule hormone hypoglycémique produite par le corps, elle induit une diminution de la production de glucose et augmente son utilisation permettant ainsi de diminuer les taux de glucose dans la circulation.

La résistance à l'insuline est un état pathologique dans lequel les tissus cibles de l'insuline (foie, tissu adipeux et muscles squelettiques) ne répondent pas correctement à cette hormone.

La cause principale de l'insulino-résistance est la masse grasse et l'obésité, en particulier lors d'une accumulation de masse grasse intra-abdominale.[112].

- Le dysfonctionnement de l'action de l'insuline en situation d'obésité implique notamment les acides gras libres en excès (lipotoxicité). Les acides gras, dans leur forme activée (acyl-CoA), sont principalement métabolisés par l'une des deux voies, oxydation ou stockage. Quand le flux d'acides gras dépasse la capacité de ces voies, comme cela se produit dans l'obésité, les acides gras et les produits intermédiaires du métabolisme des acides gras (acide linoléique, diacylglycérol (DAG), acide phosphatidique (PA), acide lysophosphatidique (LPA), céramide) s'accumulent et vont activer la phosphokinase C-thêta (PKC- Θ) chez les rongeurs, PKC β et λ chez l'Homme, via sa phosphorylation. PKC- Θ active alors deux sérine-kinases, la c-Jun NH2-terminal kinase (JNK), et l'inhibiteur de kappaB kinase (IKK). Ces deux kinases vont alors phosphoryler IRS-1 sur une sérine (serine312 chez l'homme [135], serine307 [136] chez les rongeurs). La phosphorylation de la sérine est responsable du blocage de l'IRS-1. IRS-1 est nécessaire à la signalisation en aval de l'insuline qui normalement le phosphoryle sur des résidus tyrosine. Lorsqu'il est phosphorylé sur un résidu sérine, la signalisation insulinique est bloquée [7]. Le récepteur à l'insuline alors inactivé est internalisé et dégradé

dans les lysosomes. Ceci a été décrit dans plusieurs types cellulaires parmi lesquels les cellules musculaires et les adipocytes [122].

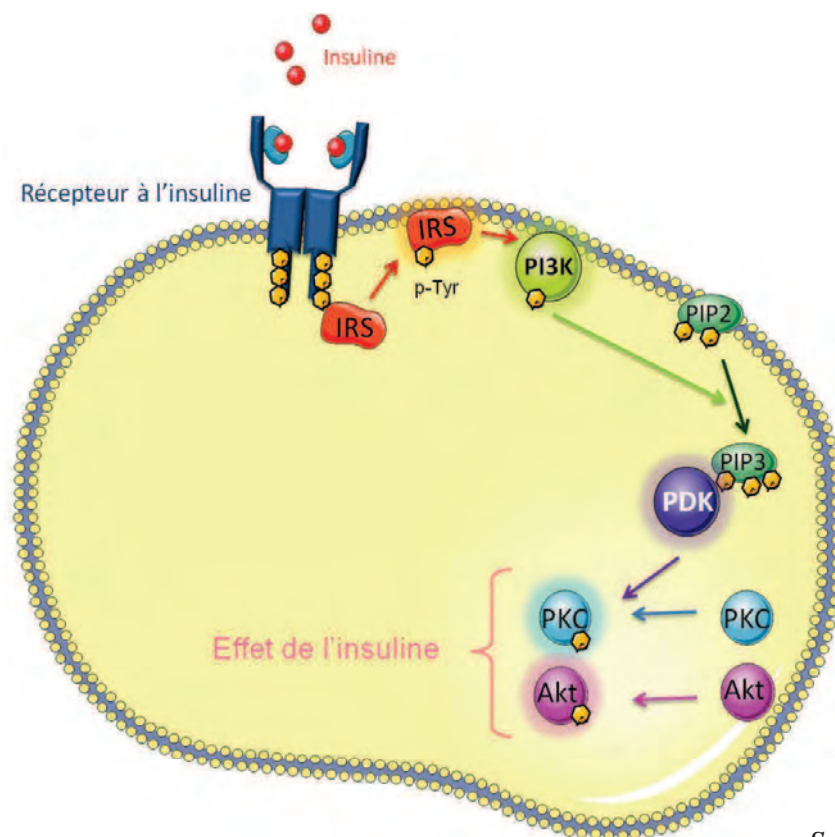
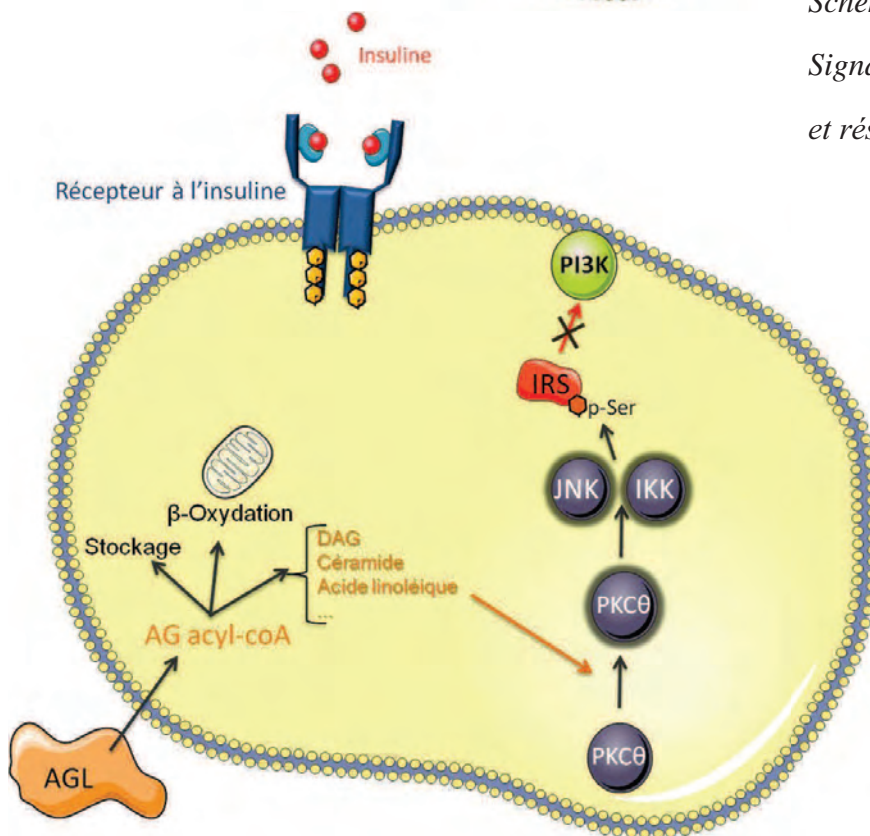


Schéma 2 :

Signalisation insulinaire (en haut)

et résistance à l'insuline (en bas)



- L'obésité s'accompagne d'un état inflammatoire chronique, à la fois en systémique et plus localement dans les tissus affectés notamment le tissu adipeux, le foie, les vaisseaux ou les muscles. Certaines études prospectives ont démontré que les marqueurs de l'inflammation permettaient de prédire l'incidence du diabète de type 2 [90, 304]. Le TNF α est une cytokine pro-inflammatoire, dont l'expression est augmentée dans le tissu adipeux des rongeurs. Le TNF α en activant son récepteur spécifique induit la voie de signalisation NF κ B *via* IKKB. Le lien entre obésité / inflammation / insulino-résistance est bien décrit chez le rongeur. Il y a 20ans, une équipe montrait que l'immuno-neutralisation de TNF dans des rats obèses (*fa/fa*) améliore leur insulino-sensibilité [159]. Dans le même sens des souris déficientes pour TNF ou son récepteur (TNFR1) ne développent pas de résistance à l'insuline lorsqu'elles sont génétiquement obèses (*ob/ob*) ou rendues obèses grâce à un régime gras [380]. Des études *in vitro* ont mis en évidence qu'une stimulation TNF α , par l'activation d' IKKB conduisait à une phosphorylation d'une sérine d'IRS1. Cette phosphorylation (comme décrit au dessus) diminue la signalisation insulinique [160].

A l'inverse, on retrouve des cytokines anti-inflammatoires comme IL-10, qui exerce ses effets en inhibant l'activation de NF κ B par le TNF α [329]. Des études chez l'homme ont montré que les individus insulino-résistants avaient des taux sériques d'IL-10 diminués [382] laissant penser que l'IL-10 a des effets insulino-sensibilisateurs. Dans ce sens, un protocole de traitement à l'IL-10 chez des souris qui reçoivent des infusions de lipides (induisant une insulino-résistance) bloque la mise en place de cette résistance à l'insuline [199]. De la même façon, *in vitro*, sur des adipocytes en culture (3T3L1), traiter avec IL-10 protège des effets du TNF α sur la résistance à l'insuline [230].

D'autres interleukines ont été étudiées, parmi les plus citées, IL-6 et IL-1 β activent IKKb/NF κ B and JNK, elles sont donc pro-inflammatoires et pro-insulino-résistantes.

Ces 2 mécanismes, lipotoxicité et inflammation, sont des mécanismes clés de la mise en place de l'insulino-résistance associée à l'obésité mais d'autres mécanismes existent notamment l'existence d'un stress du réticulum endoplasmique dans ces tissus [283, 284], l'activation de la iNOS (Inducible Nitric Oxide Synthase) [294], etc...

II-2 Le prédiabète

En situation d'insulino-résistance, les tissus insulino-sensibles répondent moins bien à l'insuline, cela se manifeste par une augmentation de la production du glucose hépatique

(principalement par de la néoglucogenèse) et une diminution des capacités hépatiques, musculaires et adipeuses à stocker le glucose ; ces altérations conduisant à une augmentation de la glycémie (voir figure page 10).

Cette hyperglycémie pourra, au départ, être normalisée par le pancréas qui augmente sa sécrétion d'insuline. Les patients seront donc normo-glycémiques et hyper-insulinémiques. C'est une phase de « pré-diabète ». Cette phase peut être plus ou moins longue, l'augmentation de la sécrétion d'insuline compense l'insulino-résistance, et ceci est accompagné d'une augmentation de la production d'insuline et de la masse des cellules β . Le pancréas endocrine a une capacité de plasticité. En effet, la masse de cellules β varie en fonction de la quantité d'insuline nécessaire pour un contrôle de la glycémie. Chez l'adulte, cette masse cellulaire est déterminée par un équilibre permanent entre la croissance des cellules (réplication et néogenèse) et la mort des cellules (principalement par apoptose). La perturbation de cet équilibre peut conduire à des changements rapides et marqués dans la masse des îlots de Langerhans. Lors de l'obésité c'est le cas, l'augmentation de la masse des cellules contribue à une hypersécrétion d'insuline en réponse à l'insulino-résistance. Une étude a ainsi mis en évidence chez l'homme que la masse relative des cellules β était augmentée dans le pancréas issu d'un individu obèse en comparaison à celle retrouvée chez un individu mince. Cette augmentation est expliquée par un mécanisme de néogenèse des cellules β en situation d'obésité [45].

II-3 De l'insulino-résistance au diabète de type 2

La résistance à l'insuline peut s'accroître jusqu'à ce que la production excessive d'insuline pancréatique soit insuffisante. L'individu devient alors gluco-intolérant c'est à dire que lors d'un apport de glucose il ne sait pas revenir rapidement et efficacement à une glycémie normale. L'individu est alors hyper-insulinémique et hyper-glycémique, ce qui caractérise un diabète de type 2. A ces altérations d'action de l'insuline, s'ajoutent des anomalies de sécrétion de l'insuline. Ces altérations de la fonction sécrétoire seraient précoces et apparaîtraient avant l'établissement du diabète de type 2 [403].

Les anomalies de la sécrétion d'insuline sont de différentes sortes.

- On retrouve premièrement une diminution de la sécrétion d'insuline (ou insulino-pénie [248]) :

L'hyperglycémie chronique, caractéristique du diabète de type 2 est à l'origine d'une gluco-toxicité qui se manifeste notamment par l'augmentation du stress oxydatif dans la cellule β . En effet, le glucose à plusieurs étapes de son métabolisme est capable d'induire la formation d'espèces actives de l'oxygène (EAOs). De plus, la cellule β pancréatique étant particulièrement pauvre en défenses anti-oxydantes enzymatiques (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase) ou non enzymatiques (glutathion réduit), est, de ce fait, particulièrement sensible au stress oxydatif (Poitout et Robertson, 2008). Ainsi les taux de marqueurs oxydatifs (nitrotyrosine et 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) sont augmentés dans les îlots de pancréas issus de patients diabétiques de type 2 [81, 233] en comparaison à ceux issus de patients non diabétiques. L'excès d'acides gras libres (AGL) est lui aussi à l'origine d'un stress oxydatif au sein de la cellule β . Ces 2 toxicités sont souvent concomitantes on parle alors de gluco-lipotoxicité. Les mécanismes pouvant expliquer cette génération de EAOs par les AGL impliquent essentiellement la mitochondrie. Lors de faibles concentrations de glucose, les acides gras sont transportés dans la mitochondrie par la carnitine palmitoyl transférase 1 (CPT-1) où ils subissent la réaction de β -oxydation. Dans le cas de concentrations élevées en glucose et en AGL, le métabolisme du glucose conduit à la formation dans le cytosol de produits comme le citrate et le malonyl-CoA. Le malonyl-CoA, en inhibant l'activité de la CPT-1 et donc l'oxydation des AGL, entraîne une accumulation d'esters d'acyl-CoA à longue chaîne dans le cytosol. Cette accumulation aboutit à la production secondaire de dérivés des lipides tels que les céramides ou les diacylglycérides (DAG). Ces dérivés, en modulant l'activité de la chaîne respiratoire (principalement en inhibant les complexes I et III) vont être à l'origine de la formation de EAOs [300]. La gluco-lipotoxicité entraîne une diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose en induisant notamment une augmentation de l'expression de UCP-2 (*Uncoupling Protein 2*), une protéine ubiquitaire de la mitochondrie impliquée dans la chaîne respiratoire. L'augmentation de UCP-2 aboutit à une diminution de la production d'ATP par la mitochondrie et donc à une inhibition de la fermeture des canaux KATP, étape à l'origine de la dépolarisation qui engendre l'ouverture des canaux calciques et la sécrétion d'insuline [57]. De plus, l'activation de la PKC ϵ par les lipides semble avoir un rôle néfaste sur la sécrétion d'insuline. En effet, il est montré qu'une inhibition de la PKC ϵ chez la souris obèse améliore la sécrétion d'insuline induite par le glucose après une exposition d'îlots de souris aux lipides. Cependant le mécanisme par lequel la PKC ϵ inhiberait la sécrétion d'insuline reste inconnu [328].

Une autre conséquence de l'exposition chronique aux AGL est la diminution de l'expression du gène de l'insuline. Les mécanismes mis en jeu sont différents de ceux affectant la sécrétion d'insuline. Le palmitate est l'acide gras principal responsable de la diminution de l'expression du gène de l'insuline. Le mécanisme transcriptionnel par lequel le palmitate inhibe l'expression du gène de l'insuline implique une inhibition de l'activité du promoteur du gène en réponse au glucose [196]. Ceci est associé à une diminution de l'activité de liaison des facteurs de transcription PDX-1. La rétention cytoplasmique de PDX-1 qui en résulte implique non seulement la diminution de l'expression du gène de l'insuline mais également celle de deux autres gènes impliqués dans la gluco-compétence, tels que le GLUT-2 et la glucokinase [190].

- On peut observer aussi des anomalies de la pulsatilité :

La sécrétion de l'insuline selon le mode pulsatile est importante pour l'efficacité de l'hormone sur le contrôle glycémique. Chez les diabétiques de type 2, on observe une disparition (dès les stades précoces de la maladie) de la sécrétion oscillatoire rapide de l'insuline [274, 275]. En plus de la réduction d'efficacité métabolique, la disparition du caractère pulsatile pourrait avoir un effet délétère pour l'îlot, car elle pourrait être à l'origine d'une surcharge calcique : des concentrations élevées et prolongées en calcium sont en effet couplées au déclenchement de signaux d'apoptose dans la cellule β [248].

- Cet état diabétique est aussi associé à des anomalies qualitatives de la sécrétion d'insuline :

Outre la diminution de la quantité d'insuline, des anomalies qualitatives de la sécrétion d'insuline sont présentes. En effet, il a été décrit une sécrétion anormalement élevée de pro-insuline et de peptides immatures (principalement la pro-insuline clivée en 32-33) dans le diabète de type 2 [186]. Ces pro-peptides peuvent représenter jusqu'à 40% des peptides sécrétés par la cellule β , alors qu'ils ne représentent que 5% chez le sujet non diabétique. Cette sécrétion anormale de pro-hormones apparaît elle aussi dans les stades précoces de la maladie.

- Enfin chez un diabète de type 2 on retrouve une altération de la masse des cellules β :

A côté de ces anomalies fonctionnelles, une des causes du déficit sécrétoire en insuline dans le diabète de type 2 est la diminution de la masse des cellules β [400]. Cette perte de masse des cellules β reste difficile à évaluer chez l'homme. En effet, seules des techniques invasives en *post mortem* permettent d'évaluer de manière fiable la masse cellulaire, de ce fait, peu d'études existent. Il a toutefois été montré que la réduction de la masse cellulaire β se situe

entre 40 à 60% chez des sujets diabétiques (obèses ou non) par rapport à des sujets témoins [46, 171].

En plus de l'inhibition de la sécrétion d'insuline, le stress oxydatif accélère également l'apoptose conduisant à une diminution de la masse cellulaire β [300]. En effet, la production de radicaux libres entraîne l'ouverture d'un pore au niveau de la membrane mitochondriale, libérant du cytochrome C qui, normalement se situe entre les deux membranes. Le cytochrome C active la voie des caspases pour aboutir au déclenchement de la mort cellulaire par apoptose [300].

L'hyperglycémie associée à l'état diabétique empire, via une importante glucotoxicité, ce phénomène en augmentant tout à la fois : l'insulino-résistance mais aussi la dysfonction pancréatique. Ces deux effets sont majoritairement dus à un effet stress-oxydant de l'hyperglycémie [264]. La culture d'îlots pancréatiques de rats en présence de fortes concentrations de glucose induit des phénomènes d'apoptose [299]. Le traitement d'îlots pancréatiques humains avec de forts taux de glucose augmente le stress oxydant, induit l'apoptose des cellules et détériore la sécrétion d'insuline induite par le glucose [82]. A l'inverse, ajouter du glutathione [81], un composé antioxydant ou une molécule neutralisant les espèces réactives de l'oxygène (molécule « scavenger ») [233] diminue les taux d'un marqueur de stress (nitrotyrosine) et restaure la fonction sécrétoire des îlots humains. Cette hyperglycémie conduit aussi à une glycation généralisée, qui peut toucher un nombre important de protéines, et qui altère leur fonction et leur demi-vie.

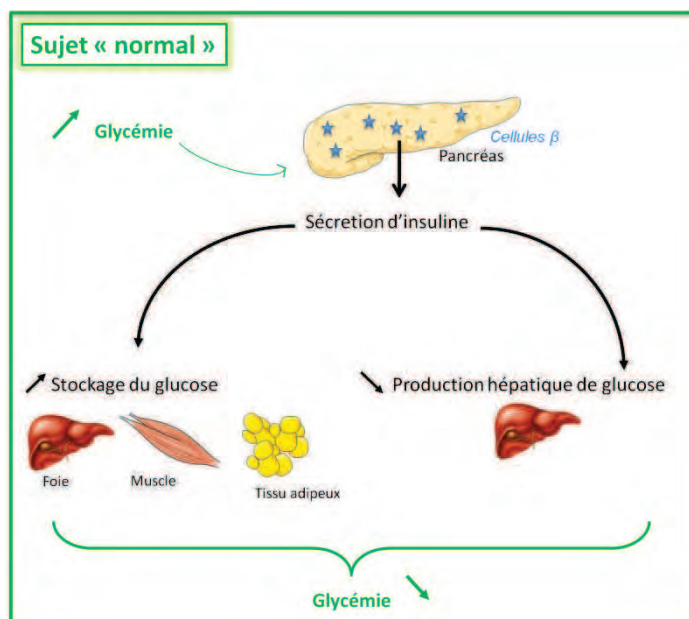
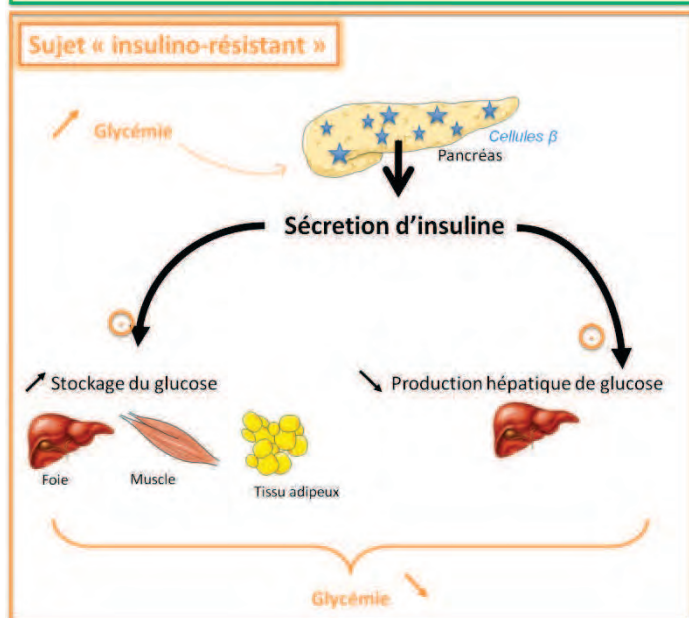
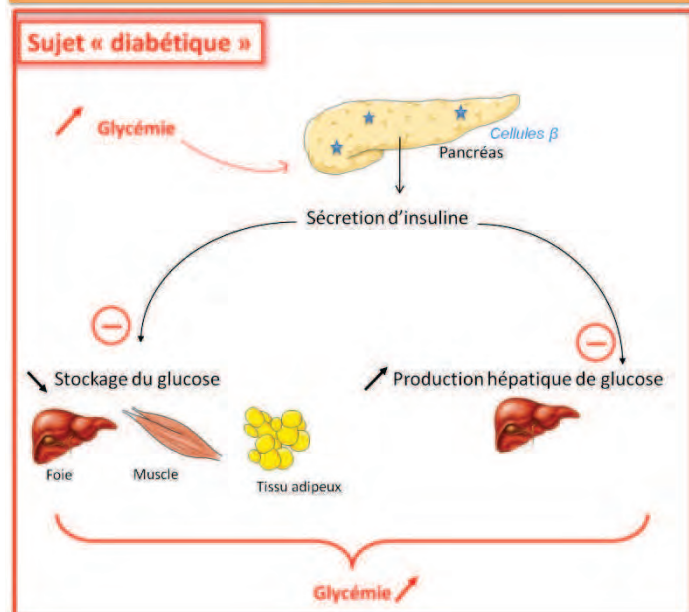


Schéma 3 : Rôle de l'insuline sur le métabolisme glucidique lors d'une hyperglycémie dans différents statuts métaboliques

Chez le sujet sain, l'hyperglycémie est détectée par les cellules β du pancréas. Elles sécrètent alors de l'insuline. L'insuline agit au niveau du foie, des muscles et du tissu adipeux pour augmenter l'utilisation du glucose et elle bloque la production hépatique de glucose. L'ensemble de ses actions permet un retour à une glycémie normale.



Chez le sujet insulino-résistant, la sensibilité périphérique à l'insuline est altérée, en compensation, le pancréas libère des quantités plus importantes d'insuline pour avoir une réponse identique et ainsi permettre de maintenir une glycémie normale.



Chez le sujet diabétique, l'insulino-résistance des tissus périphériques s'accompagne d'une altération de la sécrétion d'insuline, par un pancréas affaibli. Ces sujets ont une capacité de stockage du glucose amoindrie et une production hépatique de glucose excessive ce qui se traduit in fine par une hyperglycémie.

III- Traitements du diabète de type 2

Le diabète de type 2 et l'hyperglycémie chronique qui en résulte sont des facteurs de risques très importants pour différentes pathologies telles que les maladies cardiovasculaires (hypertension artérielle, infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux, artérite des membres inférieurs), des problèmes ophtalmologiques (cataracte, atteinte de la rétine), des risques d'ulcères ou des atteintes rénales.

Restaurer une normo-glycémie chez le diabétique reste donc la priorité. Pour cela, 3 grandes stratégies thérapeutiques sont disponibles aujourd'hui pour le clinicien :

- stimuler la sécrétion d'insuline par la cellule β ,
- diminuer la résistance à l'insuline au niveau des tissus cibles,
- diminuer l'absorption intestinale des glucides.

Selon les dernières statistiques de 2011 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 356 millions de personnes dans le monde souffrent du diabète. Les traitements proposés aujourd'hui sont insuffisants, leur administration est souvent accompagnée d'effets dégradant la qualité de vie des patients et les complications peuvent parfois favoriser des accidents graves pour la santé. Face à l'urgence, les chercheurs se mobilisent pour mieux comprendre les mécanismes d'apparition de la maladie et concevoir des thérapies innovantes. Mais comme décrit dans cette partie, la mise en place d'un diabète a de multiples causes ce qui rend sa compréhension et son traitement très complexes. Il est nécessaire que des études soient menées pour le développement de thérapies innovantes, efficaces et limitant les effets secondaires. L'un des pans de ma thèse s'intéresse à la compréhension d'un des mécanismes qui participe à la mise en place du diabète et propose des pistes physiopathologiques, voire thérapeutiques nouvelles.

Physiopathologie du tissu adipeux de l'obèse

I- Physiologie du tissu adipeux

Le tissu adipeux est un tissu conjonctif particulier contenant des cellules graisseuses, appelées adipocytes. C'est la population de cellules la plus importante de ce tissu. Le tissu adipeux comprend un second pool de cellules rassemblées dans ce qu'on appelle la fraction stroma-vasculaire. Cette fraction est composée de pré-adipocytes, fibroblastes, cellules souches mésenchymateuses, cellules sanguines et endothéliales.

L'adipocyte est une cellule extensible, dont la majorité de l'espace intracellulaire est composé d'une (tissu adipeux blanc) ou plusieurs (tissu adipeux brun) vacuoles lipidiques qui refoule(nt) le noyau et les autres organites vers la périphérie.

De façon schématique, au niveau anatomique, le tissu adipeux se localise au niveau de deux régions : sous cutanée et profonde (viscérale). La localisation du tissu adipeux varie chez l'Homme en fonction du sexe et est plus présent chez la femme (environ deux fois plus).

Le tissu adipeux, et les adipocytes en particulier, jouent un rôle prépondérant dans le maintien de la balance énergétique de part ses fonctions métaboliques de stockage (lipogenèse) et déstockage (lipolyse) des lipides. C'est une réserve énergétique considérable pour l'organisme; ainsi, le tissu adipeux d'une personne normale représenterait en énergie deux mois de jeûne. Dans le tissu adipeux, les acides gras (provenant majoritairement de l'alimentation, mais aussi de la lipolyse et la lipogenèse *de novo* (= synthèse d'acides gras à partir d'un excès de glucose)) sont stockés sous forme de triglycérides (une molécule de glycérol sur laquelle sont fixés 3 acides gras) dans les gouttelettes lipidiques. A l'opposé, l'adipocyte, pour répondre aux besoins énergétiques peut hydrolyser ses triglycérides, libérant alors à la fois des acides gras et du glycérol. Ce processus de mobilisation des graisses est appelé la lipolyse. Plusieurs facteurs vont pouvoir réguler ces deux voix métaboliques (schéma).

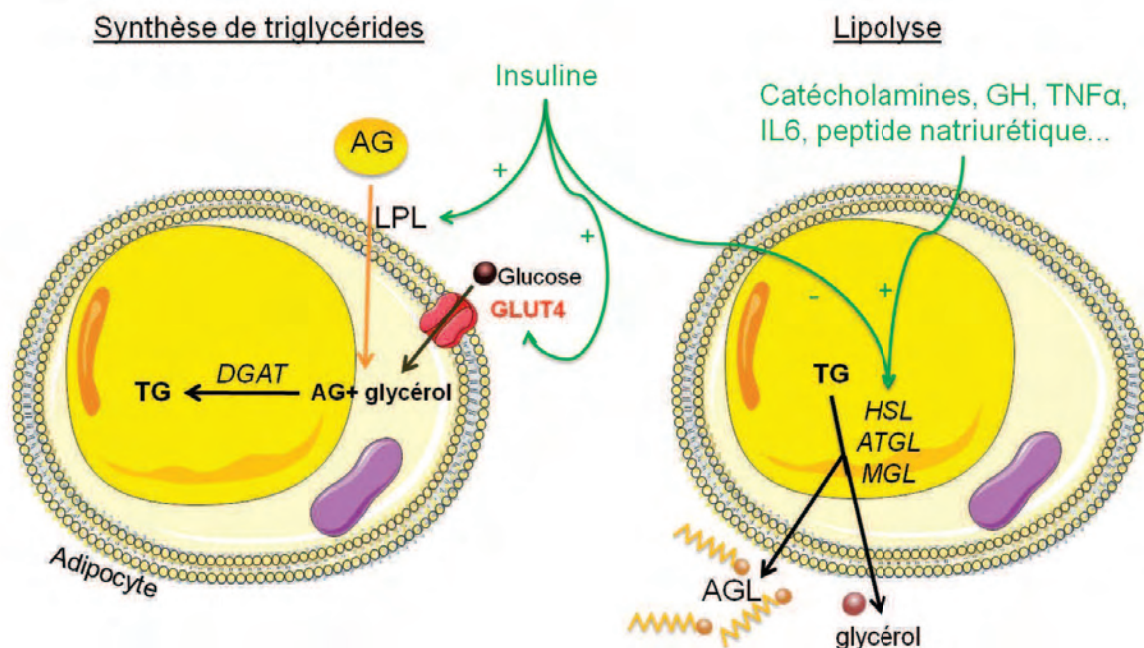


Schéma 4 : Lipomobilisation dans l'adipocyte.

Légende : AG= acides gras TG= triglycérides DGAT=diglycéride acyltransférase

HSL=lipase hormono-sensible ATGL= triglycéride lipase adipocytaire

MGL=monoacylglycérol lipase GH= hormone de croissance

Les adipocytes régulent donc l'énergie lipidique, mais ils permettent aussi de réguler le métabolisme glucidique. En effet l'adipocyte possède des récepteurs au glucose, GLUT1 et 4 majoritairement, qui permettent de réguler la glycémie. Le récepteur GLUT4, dépendant du contrôle insulinique, est très souvent étudié dans le muscle. Cependant son rôle dans l'adipocyte est aussi très important. Ainsi des souris sans GLUT4 adipocytaire développent une résistance à l'insuline et une intolérance au glucose [1]. A l'inverse, la surexpression de GLUT4 dans l'adipocyte protège de la résistance à l'insuline et de la tolérance au glucose [52]. Le transport de glucose par l'adipocyte est donc nécessaire pour le maintien de l'homéostasie glucidique chez la souris. Ce glucose permet la production du glycérol nécessaire à la formation des triglycérides (voir ci-avant). L'adipocyte peut aussi utiliser ce glucose pour former des acides gras, c'est la lipogenèse *de novo*. A partir des carbones dérivés des glucides (glycolyse et cycle de Krebs) la cellule peut, notamment grâce à l'implication de la FAS (fatty acid synthase), produire des acides gras à longue chaîne (qui pourront alors être estérifiés en triglycérides). Cette lipogenèse *de novo* dans le tissu adipeux est très clairement décrite chez le rongeur et dépend du statut énergétique de l'animal [20]. Par contre, chez l'homme, elle reste un sujet très controversé. Il était établi qu'elle était nulle [119] mais plus récemment une étude a mis en évidence qu'elle existait tout en étant beaucoup plus faible que

celle qui a lieu dans le foie [86]. Les adipocytes ont donc une fonction métabolique très importante.

A côté de cette fonction métabolique, l'adipocyte possède une importante fonction endocrine. Considéré comme une simple cellule de stockage des acides gras, l'adipocyte est reconnu depuis quelques années comme une cellule sécrétrice de molécules biologiquement actives regroupées sous le terme générique d'adipokines. La composition et le rôle de ce sécrétome sont particulièrement étudiés dans mon équipe appelée : « Sécrétions adipocytaires, obésités et pathologies associées ». Parmi ces adipokines, on peut distinguer notamment des hormones, des cytokines, des facteurs de croissances, etc. de nature lipidique, peptidique ou glycoprotéique. Il est important de préciser que l'adipocyte ne participe que pour partie à la totalité du sécrétome du tissu adipeux. En effet, si certaines adipokines sont spécifiquement produites par l'adipocyte lui-même, d'autres sont issues de la fraction stroma-vasculaire ou des deux. La encore la terminologie de ce terme est assez controversée. Ces adipokines sont très nombreuses et très différentes, et vont ainsi pouvoir avoir des effets biologiques de modulation du métabolisme lipidique, de la réponse immunitaire et de l'inflammation, de l'homéostasie vasculaire et de l'angiogenèse, de la pression artérielle, de l'appétit et la dépense énergétique, du transport de nutriments, mais aussi de la signalisation de l'insuline et du métabolisme glucidique [95, 317]. Ce concept d'adipokine est né au début des années 90 grâce à la découverte de la leptine par l'équipe de Friedman [429]. La leptine est fortement étudiée pour son action métabolique tant au niveau périphérique qu'au niveau central. Avec elle, et parmi les adipokines les plus connues nous pouvons citer l'adiponectine, la résistine, la visfatine, le TNF α ou l'apeline (étudiée dans mon équipe).

Lors de l'expansion du TA en situation d'obésité, la sécrétion de ces adipokines peut être modifiée. Dans ces conditions certaines ont été décrites comme ayant un rôle dans l'étiologie de l'obésité mais aussi dans la mise en place de différentes pathologies associées à l'obésité. En effet ces adipokines peuvent avoir une action locale (auto/paracrine) mais peuvent aussi être libérées dans la circulation (endocrine) et agir à distance à la façon des hormones.

En situation d'obésité, le sécrétome est modifié, de façon qualitative et quantitative. Certaines adipokines vont alors participer à la mise en place de pathologies associées à l'obésité comme la résistance à l'insuline [311], d'autres au contraire auront un effet protecteur. Dans cette thèse nous nous sommes intéressés à l'une de ces adipokines, de nature lipidique, l'acide lysophosphatidique (partie 5).

II- Expansion du tissu adipeux

Le tissu adipeux est l'organe du corps qui a la plus grande capacité à changer de volume. L'expansion du tissu adipeux peut se faire de 2 façons : augmentation de la taille ou du nombre d'adipocytes. L'hypertrophie adipocytaire est caractérisée par des adipocytes plus gros et qui accumulent plus de triglycérides. L'hyperplasie adipocytaire, consiste en l'augmentation du nombre d'adipocytes ; ce processus est appelé l'adipogenèse. C'est un processus qui associe la prolifération de progéniteurs (pré-adipocytes) et la différenciation de ces pré-adipocytes en adipocytes.

Lors d'un apport excessif, les adipocytes existants vont stocker les lipides en excès contribuant à l'augmentation de leur taille. Après cette phase d'hypertrophie, de nouveaux adipocytes sont formés à partir des pré-adipocytes, c'est une phase d'hyperplasie qui se met en place. Si chez l'animal ce dernier phénomène est bien décrit, par exemple hyperplasie lors d'un régime hyper-énergétique [99], chez l'homme cela reste controversé. Une étude met en évidence que le nombre d'adipocytes chez l'Homme serait fixe à l'adolescence et la prise de poids se traduirait par une augmentation du volume des adipocytes sans variation de leur nombre [340]. Une autre étude de surnutrition chez l'Homme montre le même mécanisme unique d'hypertrophie [321]. Cependant une étude a mis en évidence la mobilisation de nouvelles cellules avec pour conséquence une augmentation du nombre d'adipocytes dans le tissu adipeux sous-cutané d'individus soumis à une surnutrition de 8 semaines [365]. Si chez l'homme les variations du nombre d'adipocytes restent discutées, il a été mis en évidence qu'environ 10% des cellules graisseuses sont renouvelées chaque année à l'âge adulte et cela à tous les niveaux d'indice de masse corporelle [340].

L'expansion du tissu adipeux peut se faire dans les 2 principaux dépôts : sous-cutané et viscéral, mais lors d'une obésité importante, de nouveaux dépôts vont s'accroître ou apparaître notamment autour des reins, du cœur etc. L'augmentation de la masse adipeuse viscérale est associée à un risque élevé de maladies cardio-vasculaires et de diabète de type 2 en comparaison à une accumulation de graisses sous-cutanées. Les dépôts viscéraux, au niveau intra-péritonéal, entourent notamment les organes génitaux (tissu péri-gonadique) et les intestins (tissu mésentérique). Ces dépôts sont très près de la circulation sanguine, de part leur proximité avec le système portal hépatique. Bien que ces données physiopathologiques ne soient pas totalement élucidées, il a été décrit que les adipocytes des dépôts viscéraux sont plus actifs en terme de lipolyse que les adipocytes des tissus sous-cutanés, et ils sont moins

sensibles à l'insuline (moins de récepteurs). A l'opposé, le tissu sous-cutané absorbe mieux les acides gras libres, et stocke de façon plus importante les lipides. [166, 239].

L'expansion du tissu adipeux peut chez certains individus se faire de façon très importante sans pour autant que le sujet ne développe d'altérations métaboliques classiquement associée comme l'insulino-résistance. Ainsi 10 à 25% de la population obèse est dite métaboliquement saine [33]. Pour le reste, il existerait une limite à l'expansion du tissu adipeux, limitant le stockage de lipides dans ce tissu et favorisant le stockage ectopique dans des tissus non spécialisés pour le stockage comme le foie, les muscles, le cœur ou le pancréas. Ce stockage ectopique induit une lipotoxicité qui peut ainsi conduire aux troubles métaboliques associés à l'obésité [224, 360, 391]. En ce sens, des études récentes ont rapporté que les sujets obèses métaboliquement en bonne santé avaient une accumulation de gras dans le foie 54% moindre que celle présente chez des obèses « malades » ainsi qu'une plus faible infiltration de graisse musculaire [91, 245, 305, 347]. Les causes de ce défaut d'expansion du tissu adipeux ne sont pas encore complètement élucidées mais l'état de l'adipocyte et le remodelage de son environnement pourraient altérer l'expansion du tissu. En effet, en situation d'obésité, le tissu adipeux subit un véritable remodelage [14], avec des processus d'angiogenèse, des remaniements de la matrice extracellulaire ou l'infiltration de cellules inflammatoires dans ce tissu [209, 316, 352].

III- Physiopathologie du TA de l'obèse

Les épisodes de balance énergétique positive sont des stress nutritionnels qui forcent l'organisme à s'adapter. Le tissu adipeux s'adapte par la mise en place d'un stockage de l'énergie excédentaire se traduisant par son expansion. Mais au cours de l'obésité ces mécanismes d'expansion peuvent atteindre leurs limites et entraîner alors des défauts au sein de l'adipocyte et de son environnement. C'est une véritable « pathologie » du tissu adipeux. L'équipe de Bays et al, a formé l'Adiposopathy Working Group et parle de « sick fat » ou tissu adipeux malade [23, 25].

III-1 Flux d'acides gras libres

La libération d'acides gras dans la circulation est positivement corrélée à la quantité de masse grasse [34, 109]. L'obésité est à l'origine d'une augmentation des taux d'acides gras libres non estérifiés, et cela même lorsqu'il n'y a pas encore de troubles du métabolisme adipocytaire [214].

Dans la partie précédente nous avons vu que ces flux importants de lipides vont participer à l'apparition de pathologies associées à cette obésité.

III-2 Hypoxie

La croissance des vaisseaux sanguins (un processus connu sous le nom angiogenèse) est un élément essentiel pour la croissance et la réparation de tous les organes [51]. Un déséquilibre dans ce processus contribue à la pathogenèse de nombreux troubles. Les adipocytes hypertrophiques peuvent atteindre des volumes très importants (100µm). Ces tailles sont supérieures à la distance maximale de diffusion de l'oxygène créant ainsi des zones d'hypoxie. Cette hypoxie, due à une réduction significative de l'approvisionnement cellulaire en oxygène, est à l'origine de la mort des adipocytes.

Face à ce type de stress, les adipocytes vont mettre en place des systèmes, afin de s'adapter en induisant par exemple l'érythropoïèse ou l'angiogenèse, par le biais de HIF1α (*hypoxia inducible factor*), un facteur de transcription dégradé en présence d'oxygène et fonctionnel en présence d'hypoxie. Son accumulation, qui reflète une hypoxie locale, permet l'activation de nombreux gènes spécifiques.

Ainsi au cours de la prise de poids, le réseau vasculaire adipeux s'adapte pour répondre aux besoins en nutriments et en oxygène. Les liens entre le réseau vasculaire et le développement du tissu adipeux sont bien illustrés chez le rongeur [49], ainsi l'utilisation de molécules bloquant l'angiogenèse induit une perte de poids [39]. Un certain nombre d'études récentes confirment que de la perturbation de la néo-vascularisation du tissu adipeux peut prévenir l'apparition de l'obésité à la fois génétique et induite par l'alimentation. Elles offrent ainsi une option thérapeutique pour le traitement de l'obésité et les troubles métaboliques liés [50].

Exposer des adipocytes à des conditions de culture hypoxiques régule l'expression de milliers de gènes. La cellule passe d'un métabolisme oxydatif à une glycolyse anaérobie. L'utilisation du glucose est augmentée et conduit à une production importante de lactate. L'hypoxie induit aussi une résistance à l'insuline des adipocytes et conduit au développement de la fibrose (paragraphe 6) [373]. Chez l'homme néanmoins, cette notion est plus controversée et vient d'être remise en cause par l'équipe de Frayn [155]. Cependant, dans ce papier, il faut noter que les sujets de l'étude sont en surpoids plutôt qu'obèses.

III-3 Stress oxydant

Si la production d'espèces réactives de l'oxygène est un phénomène complètement physiologique et nécessaire, puisque impliqué dans certaines voies de signalisation et, notamment dans la transduction du signal insulinaire [205], une production excessive ou durable de ces espèces réactives de l'oxygène liée à un dysfonctionnement mitochondrial devient pathogène. On parle alors de stress oxydant. Il a ainsi été montré qu'un stress oxydant bloque l'entrée de glucose (*via* le transporteur GLUT4) dans le muscle et le tissu adipeux [277]. Récemment, l'implication des espèces réactives de l'oxygène en tant que facteur causal de l'insulino-résistance a été clairement établie [162]. Au cours de l'obésité, l'accumulation de graisse au niveau du tissu adipeux conduit à l'induction d'un stress oxydant systémique, chez la souris et l'homme [116, 378].

Lorsque des cultures d'adipocytes sont traitées par des acides gras, on observe une augmentation de production d'espèces réactives de l'oxygène avec une induction de la NADPH oxydase et une diminution de l'expression des enzymes anti-oxydantes (catalase, superoxyde-dismutase, glutathion-peroxydase) [116].

III-4 Stress du réticulum endoplasmique

De nombreux stress physiopathologiques tels que l'hypoxie, ou le stress oxydant mais aussi l'inflammation (paragraphe suivant) provoquent des perturbations du réticulum endoplasmique aboutissant à un stress. Dans ces conditions, l'organite dispose d'un système complexe de réponse appelé UPR (*unfolding protein response*) qui met en jeu plusieurs protéines. Le stress du réticulum endoplasmique se présente en quelque sorte comme un point de convergence de nombreux autres stress et comme un relais de l'activation de voies JNK et IKK (voir introduction partie 2). A ce titre, il est légitime de le considérer comme un événement majeur de l'insulino-résistance [104]. Il a plusieurs fois pu être établi un lien entre le stress du réticulum endoplasmique et des pathologies métaboliques telles que l'obésité et/ou le diabète de type II [259, 428]. Ainsi, l'obésité est un facteur d'induction du stress du réticulum endoplasmique, notamment dans le foie et le tissu adipeux de souris, ce qui participe à l'insulino-résistance. La mise en place de la réponse UPR dans les cellules hépatiques entraîne notamment une diminution de la phosphorylation sur tyrosine de IRS-1 [283]. Parallèlement à ce phénomène, l'induction de la JNK par Ire-1 [379] augmente les phosphorylations inhibitrices sur IRS-1. Au niveau du tissu adipeux, il a été montré que l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique dans l'adipocyte de souris inhibait le transport de glucose stimulé par l'insuline [290]. Par ailleurs, l'amélioration du stress du réticulum endoplasmique (c'est-à-dire la diminution de la phosphorylation ou de l'expression de tous les acteurs impliqués) permet l'amélioration de la sensibilité à l'insuline au niveau du tissu adipeux de souris génétiquement obèses [284].

III-5 Inflammation

En situation d'obésité, le tissu adipeux développe une inflammation avec une infiltration de cellules de l'immunité et la production dans le sécrétome adipeux d'un nombre important de cytokines pro-inflammatoires.

Chez la souris, il a été montré que les adipocytes hypertrophiques vont dans un premier temps commencer à sécréter de faibles niveaux de TNF- α , qui stimulent la production de MCP-1 par les pré-adipocytes. Les cellules endothéliales sécrètent également MCP-1 en réponse aux cytokines. MCP-1 est une molécule chémo-attractante. Ainsi, les pré-adipocytes et les cellules endothéliales semblent être responsables de l'attraction des macrophages dans le tissu adipeux grâce à la sécrétion active de MCP-1. Cependant, les raisons mêmes de cette sécrétion de chimiokines participant à l'infiltration macrophagique du tissu adipeux sont mal connues mais il a été proposé que cette sécrétion résulte d'un stress dû à l'hypertrophie adipocytaire [402].

Cette étape de recrutement macrophagique semble contribuer à la mise en place de l'insulino-résistance puisque son blocage permet d'améliorer l'insulino-résistance chez la souris obèse [189]. A l'inverse, la surexpression de MCP-1 dans le tissu adipeux augmente logiquement l'infiltration macrophagique et diminue la sensibilité à l'insuline [187]. Toutefois, l'importance de ce facteur est encore discutée puisque des auteurs ont rapporté que des souris MCP-1 $-/-$ ne présentaient pas de diminution de l'infiltration macrophagique et ne montraient pas d'amélioration de l'insulino-sensibilité au cours de la mise en régime gras des animaux [176].

Cette augmentation du nombre de macrophages est l'une des anomalies cellulaires majeures qui caractérise le tissu adipeux obèse. Ils peuvent parfois représenter plus d'un quart des cellules composant le tissu adipeux, contre moins de 2% chez l'humain sain [47]. Les macrophages vont former des structures caractéristiques en forme de couronne autour des adipocytes présentant des signes de mort cellulaire et cela particulièrement dans les dépôts viscéraux [231, 267, 401]. On appelle ces structures spécifiques des *crown-like* structures. Les macrophages exercent alors leur rôle de phagocytose. La taille de l'adipocyte est directement corrélée avec l'accumulation de macrophages dans le tissu adipeux [401]. Il existe dans le tissu adipeux d'individus obèses, une modulation très importante des ARN codants pour des protéines de la réponse inflammatoire, aussi bien chez les rongeurs que chez l'homme. On sait aujourd'hui qu'une grande partie de ces variations de profil d'expression génique au cours de l'obésité est due à une infiltration de macrophages au sein du tissu adipeux [70]. En effet les macrophages produisent et sécrètent de nombreuses cytokines inflammatoires comme TNF α , IL-6, IL-1 β et produit à son tour MCP-1 accentuant ainsi le recrutement de nouveaux macrophages. La libération de ces cytokines inflammatoires participe aussi à la mise en place de l'insulino-résistance [30]. Par exemple, il a été montré, sur des adipocytes humains, qu'un traitement par le TNF α induisait une modulation de certaines adipokines [395]. A l'inverse, des souris obèses, invalidées pour TNF α présentent une amélioration de leur sensibilité à l'insuline et de leur métabolisme glucidique [380]. De la même façon que le TNF α , si des adipocytes humains sont traités par l'IL-6, ils développent une insulino-résistance [314] en diminuant notamment les transcrits des transporteurs au glucose GLUT4. Une autre étude a mis en évidence la capacité de l'IL-1 à induire une insulino-résistance au niveau du tissu adipeux en inhibant le transport du glucose induit par l'insuline [179] *via* une diminution de l'expression d'IRS-1 d'une part, et une diminution de la phosphorylation du résidu tyrosine d'IRS-1 en réponse à l'insuline d'autre part [179].

La composante inflammatoire de l'obésité est aussi fortement impliquée dans la régulation des adipokines, qui peuvent elles aussi réguler le statut de sensibilité d'insulino-sensibilité ou participer à la mise en place d'une autre altération qui affecte le tissu adipeux obèse malade: la fibrose.

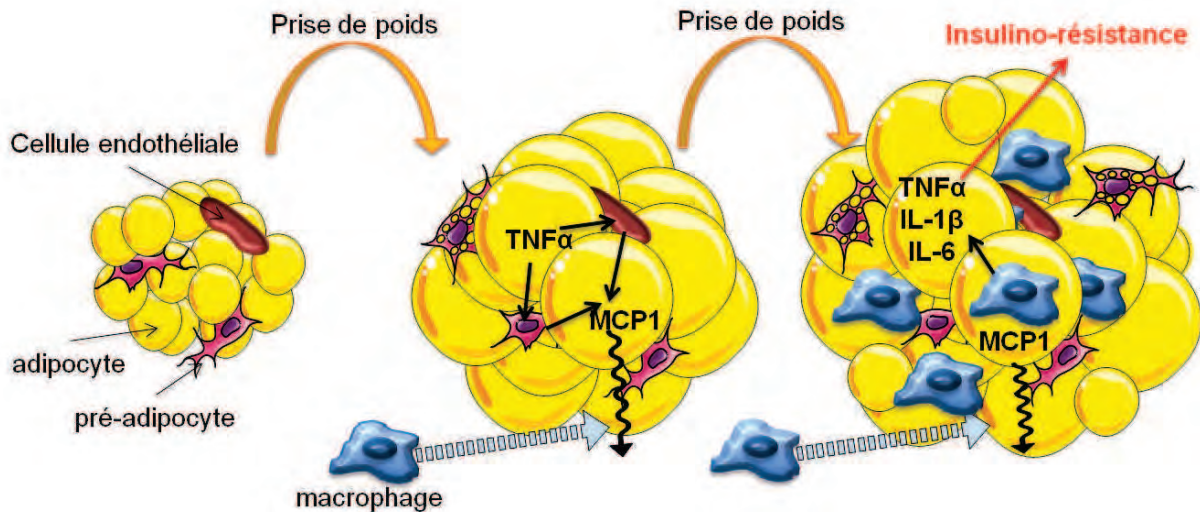


Schéma 5 : Inflammation du tissu adipeux obèse

III-6 Remodelage matriciel et fibrose

- **La matrice extra-cellulaire**

Le tissu adipeux est un tissu conjonctif. Les adipocytes sont regroupés en lobules séparés par des cloisons de tissu conjonctif lâche. La matrice extracellulaire est une structure multi-moléculaire complexe organisée en un réseau tridimensionnel. La matrice extracellulaire du tissu adipeux est composée des mêmes types de protéines que les autres tissus [238]. Une étude ancienne avait mis en évidence la présence de matrice extracellulaire au sein du tissu adipeux décrite comme un réseau de fibres de collagène autour des cellules adipeuses [263]. Actuellement, il est connu que la matrice du tissu adipeux est composée de protéines structurales (collagènes) ainsi que de protéines d'adhérence telles que la fibronectine, la laminine, les élastines et les protéoglycanes [88, 327]. Plusieurs types de collagène se trouvent dans le tissu adipeux (I, IV, V, VI, VII, VIII et IX), parmi ceux-ci, le collagène VI est celui le plus fortement enrichi [291, 327].

Cependant, il faut noter que la différenciation adipocytaire s'accompagne de modifications spécifiques du réseau matriciel. Des études *in vitro* ont montré une diminution de la synthèse de la fibronectine pendant le développement adipocytaire, tandis que les molécules de la membrane basale, y compris le collagène IV, la laminine et le sulfate d'héparane semblent augmenter [257, 298]. À cet égard, la différenciation de cellules 3T3-F442A est accompagnée d'un remodelage de la matrice extracellulaire avec une diminution de la synthèse des protéines du cytosquelette (β et γ -actine, vimentine, α et β -tubuline et fibronectine), en parallèle d'une augmentation de la biosynthèse des enzymes lipogéniques, ce qui suggère que les changements du cytosquelette peuvent influencer sur la nouvelle expression des gènes nécessaires à l'adipogenèse (Spiegelman et Farmer, 1982; Spiegelman et Ginty, 1983). Depuis, d'autres études ont mis en évidence que la matrice extracellulaire régulerait l'adipogenèse [38, 244, 396].

Sur des coupes de tissu adipeux, les collagènes peuvent être visualisés par coloration rouge Sirius ou trichrome de Masson. Cette matrice est sans arrêt renouvelée; physiologiquement, il existe un équilibre entre des phénomènes de synthèses et de dégradations [238]. Chaque adipocyte est entouré par une fine couche de matrice appelée lame basale qui est majoritairement composée de collagène de type 4 [238]. Lors de l'hypertrophie adipocytaire, la membrane plasmique des adipocytes est soumise à des forces très importantes exercées par la gouttelette lipidique, et la lame basale pourrait alors protéger la membrane des adipocytes [238]. De plus, lorsque le tissu adipeux grossit, la matrice extracellulaire subit un remodelage important. En effet, lors de l'hypertrophie des adipocytes, la matrice doit être dégradée pour permettre l'augmentation du volume des adipocytes. La dégradation de la matrice est due principalement au système des MMPs et au système fibrinolytique [221, 222]. Les MMPs sont responsables du remodelage en dégradant des protéines telles que les collagènes, les protéoglycanes, l'élastine. L'expression des MMPs peut être contrôlée au niveau protéique par l'activation d'inhibiteurs endogènes: les TIMPs [132]. Le système fibrinolytique est constitué par le plasminogène, une pro-enzyme inactive qui peut être convertie en une enzyme active: la plasmine. La plasmine dégrade la fibrine [222]. Il existe deux activateurs du plasminogène, un activateur tissulaire (t-PA) et un activateur de type urokinase (u-PA). De plus, ce système est fortement régulé par l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) [13]. Si l'on bloque la dégradation de la matrice, le tissu ne peut pas s'expandre. Cela a notamment été mis en évidence par un blocage génétique [383] et pharmacologique [384] des métalloprotéases matricielles (MMP), enzymes responsables de la dégradation de la matrice. Les MMP et PAI1

sont fortement exprimés dans le tissu adipeux des sujets obèses [12, 59, 237, 383]. Les cathepsines peuvent également contribuer aux processus de remodelage à travers leur activité protéolytique envers l'élastine et les collagènes. De la même façon que pour l'invalidation des MMP, l'invalidation de la cathepsine K, et L chez la souris induit une perte d'adiposité [114, 419, 420].

• *Généralités sur la fibrose*

Lorsque cette expansion est trop importante, on observe un déséquilibre avec apparition de fibrose. La fibrose est une lésion élémentaire du tissu conjonctif définie par l'augmentation des constituants fibrillaires de la matrice extracellulaire dans un tissu ou un organe. Elle est une composante fréquente des processus inflammatoires mais peut aussi survenir dans d'autres conditions pathologiques (pathologies vasculaires, métaboliques, tumorales...). La sclérose est l'induration des tissus liée à la fibrose (il s'agit donc d'un terme macroscopique mais souvent employé comme synonyme de fibrose). D'un point de vue morphologique, un tissu fibrosé est blanchâtre ; plus la fibrose est ancienne, plus le tissu sera de consistance ferme ou dure et plus résistant à la coupe que le tissu normal.

En général la fibrose est considérée comme un processus de cicatrisation mal contrôlée. Lors d'une atteinte tissulaire ou d'une inflammation chronique des cellules de l'immunité arrivent dans le tissu. Elles libèrent différentes molécules inflammatoires (TNF α , IL6...) et pro-fibrosantes (TGF β , MMPs, TIMPs...). Cela induit des phénomènes d'angiogenèse et la prolifération et l'activation de cellules particulières, les myofibroblastes qui ont la capacité de produire des molécules matricielles en très grandes quantités. En fonction des tissus, ces nouvelles cellules myofibroblastiques peuvent provenir de différents types cellulaires (fibroblastes résidents, cellules provenant de la transition épithélio-mésenchymateuse, fibrocytes, ou d'autres cellules résidentes comme les cellules stellaires du foie). Ces cellules sont recrutées dans les processus « classiques » de cicatrisation, mais dans le cas de la fibrose on a une activation durable de ces myofibroblastes et un déséquilibre entre la dégradation de la matrice (balance MMPs/TIMPs) et cette synthèse importante. Cela conduit à une accumulation exagérée de matrice. Une fibrose constituée peut rester stable, s'aggraver sous l'action répétée d'agressions tissulaires, ou régresser (évolution concernant le plus souvent des fibroses récentes (avant que des ponts γ -glutamyl-lysine au niveau des protéines matricielles ne se soient formés et nécessitant la disparition du stimulus initial de la fibrose)).

Elle peut se développer dans de nombreux organes (peau, foie, poumons, cœur, rein), sa présence est souvent associée à une perte de l'architecture tissulaire conduisant à la perte de la fonction de l'organe touché. Elle est ainsi responsable de différentes pathologies et au Etats-Unis, on estime que 45% des décès survenant dans le pays seraient attribuables à un désordre à composante fibrotique [410].

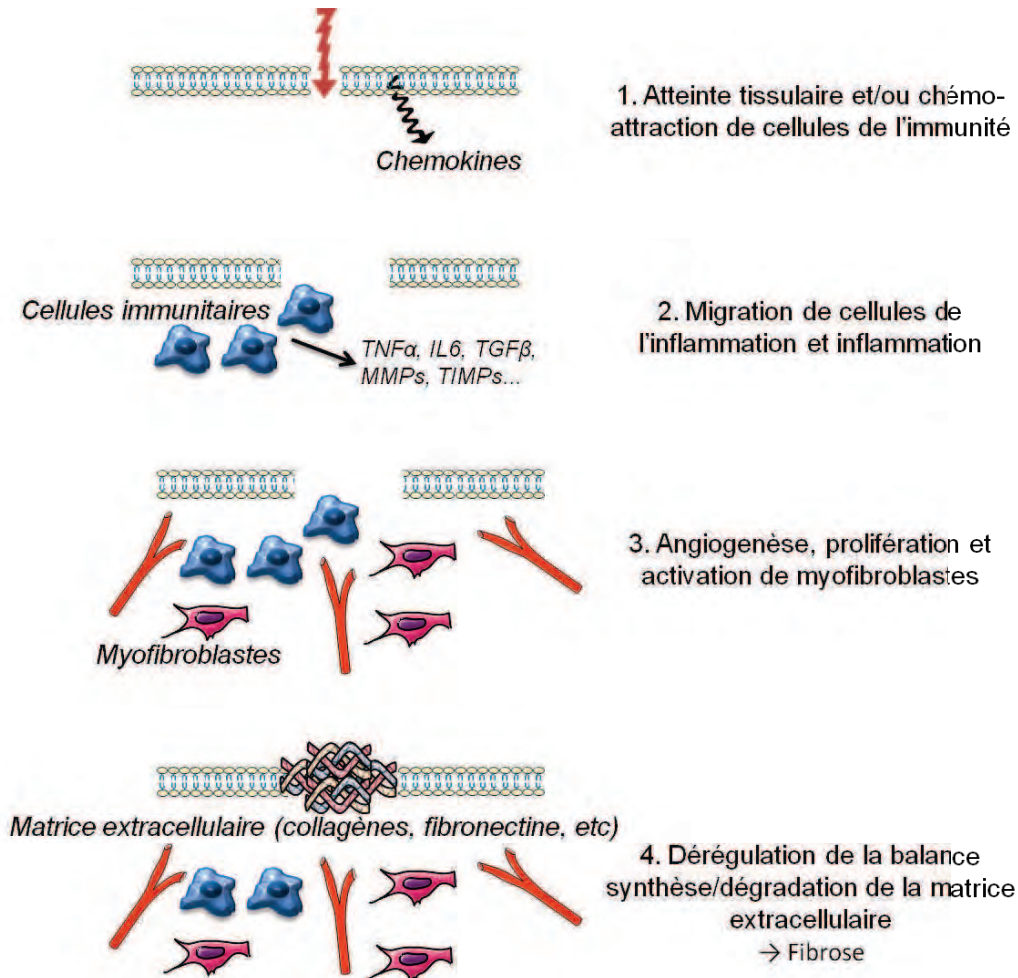


Schéma 6 : Mécanismes généraux de mise en place d'une fibrose

TNF : facteur de nécrose tumorale *IL* : interleukine *TGF* : facteur de croissance transformant
MMP : métalloprotéinase matricielle *TIMP* : inhibiteur tissulaire des *MPP*

Inspiré de [409]

• La fibrose du tissu adipeux

- Dans le tissu adipeux, les adipocytes et les cellules de la fraction stroma-vasculaire contribueraient tous deux à la synthèse et au remodelage des composants de la matrice [209]. Cependant, en situation de fibrose, il est suggéré que ce sont les pré-adipocytes qui auraient la fonction de myofibroblastes (*a priori* absents de ce tissu). En effet, il a été démontré qu'en

présence d'un environnement inflammatoire, les pré-adipocytes sécrètent des molécules pro-fibrosantes comme les collagènes, la fibronectine, ainsi que des protéines de la famille du TGF- β , comme l'activine A [197]. Par ailleurs, lors de l'obésité, les macrophages du tissu adipeux sécrètent les interleukines (IL) IL-6 et IL-10, connues également pour favoriser l'activation du TGF- β .

- La fibrose du tissu adipeux est encore peu étudiée. Elle a été mise en évidence pour la première fois chez l'homme en 2008 par le groupe de Karine Clément [149]. Des dépôts fibrotiques ont été détectés chez le sujet obèse par rapport aux sujets sains [87, 149]. Cela a été mis en évidence au niveau transcriptionnel [149] avec une corrélation avec l'IMC. Cela a aussi été mis en évidence au niveau histologique montrant chez l'obèse différents types de dépôts fibrotiques: de larges bandes de collagène traversant le tissu, et des dépôts autour des adipocytes [87]. Ce sont les formes I, III et IV qui seraient impliqués dans les processus de fibrose tissulaire [88]. Une étude récente a mis en évidence chez l'homme, l'apparition d'une accumulation de matrice après seulement 56 jours de surnutrition (+ 760kCal / jour) [14]. La fibrose s'organise en amas denses et en travées et est constituée des collagènes I et III. Chez le sujet obèse il existe également une fibrose péri-cellulaire qui entoure les adipocytes [66, 87] et qui est constituée de collagène VI. Il a été montré que l'expression du collagène VI était augmentée avec l'IMC et que cette augmentation était accompagnée de l'inflammation du tissu [291].



Fibrose du tissu adipeux :

Immunohistochimie de tissu adipeux sous-cutané chez le sujet. © Joan Tordjman Tiré de Médecine des Maladies Métaboliques Volume 6, Issue 3, June 2012 Divoux et coll

Chez l'homme, l'expression de la thrombospondine (TSP1), composante de la matrice, a été rapportée dans le tissu adipeux de façon corrélée à l'IMC [389]. Si certains constituants de la matrice sont clairement surexprimés chez l'obèse, l'expression de la fibronectine, au moins

chez l'homme, semble plutôt diminuée [211]. C'est également le cas pour l'élastine dont l'expression est diminuée chez le sujet obèse et dans le cas d'une co-culture d'adipocytes avec des macrophages [342].

Ces résultats d'expression génique et d'histologie seraient peut être à nuancer, en effet, une étude récente a montré que si l'obésité chez l'homme et chez la souris est effectivement associée à une surexpression des ARNm du collagène I, cela ne se révèle pas vrai lors d'une analyse protéique. Cela s'explique plutôt par une augmentation très importante des MMPs, notamment MMP9 (en transcrits et en protéines) [5].

Une étude menée chez l'enfant a mis en évidence une moindre quantité de collagène au sein du tissu adipeux des enfants obèses par comparaison aux enfants normaux [359]. Chez les sujets sains, la quantité de matrice diminue avec l'âge. Ces données suggèrent que les dépôts matriciels pourraient bloquer le développement du tissu, et qu'ainsi, avec l'âge ou avec l'obésité, des quantités plus faibles de cette matrice permettraient l'expansion du tissu.

Chez la souris la fibrose du tissu adipeux a aussi été mise en évidence. Ainsi un régime riche en lipides de 24 semaines induit une fibrose dans le tissu adipeux, bien visible par marquage histologique [153, 164, 220]. D'un point de vue transcriptomique, l'étude met en évidence une surexpression des collagènes uniquement dans les temps précoces du régime (2 semaines) en comparaison aux taux d'expression dans les souris sous régime normal. D'autres gènes sont régulés, les métalloprotéases matricielles (MMP), la décorine, etc De la même façon, une obésité génétique (souris *db/db* et *ob/ob* (voir partie Obésité V) [198], ou une obésité chimique (induite par l'auro-thio-glucose) [276] induisent une exagération de l'expression du collagène dans le tissu adipeux. Une augmentation de l'expression de la thrombospondine (TSP1) a été rapportée dans le tissu adipeux des modèles murins d'obésité [393] et il a été montré que les souris déficientes pour TSP1 présentent une meilleure tolérance au glucose et de l'insuline sensibilité [218].

- Pour palier l'excès de matrice extracellulaire et permettre l'hypertrophie adipocytaire, en situation d'obésité, l'activité protéolytique est importante. Un modèle d'obésité nutritionnelle induite chez des souris déficiente pour l'une des deux formes d'activateur du plasminogène (t-PA ou u-PA) a révélé que si les souris invalidées pour t-PA avaient un poids de masse grasse supérieur accompagné par une augmentation du diamètre adipocytaire, la suppression de u-PA n'avait aucun effet [249]. Des concentrations élevées de PAI-1 sont une caractéristique de l'obésité viscérale. Sa production semble être attribuée au compartiment stromal et

principalement aux macrophages infiltrant le tissu adipeux [22, 94]. L'expression de MMP9 dans le tissu adipeux est augmentée chez le sujet obèse et insulino-résistant ainsi que dans les adipocytes en co-culture avec des macrophages [377]. Il a également été décrit une hausse de l'expression de MMP2, 3, 12, 19 et 14 dans le tissu adipeux de souris génétiquement obèses *ob/ob* ainsi que chez des souris dont l'obésité a été induite par l'alimentation. L'expression de MMP7 est par contre régulée à la baisse [59, 79, 237]. Une étude a mis en évidence que la sur-expression des gènes se traduisait pour MMP2 et MMP9 par une augmentation des taux circulants chez des patients obèses [83]. La cathepsine K (CTSK) est une protéase qui peut dégrader plusieurs constituants de la matrice, de par ses activités collagénase et gélatinase [58]. Les niveaux d'expression de la CTSK sont augmentés dans le tissu adipeux de divers modèles d'obésité murins [62] ainsi que chez l'homme de façon corrélée à l'IMC [411] et diminuent après la perte de poids [262, 358].

• ***Causes possibles de la fibrose du tissu adipeux***

- La fibrose du tissu adipeux peut avoir différentes causes, parmi elles, l'inflammation et notamment les sécrétions des macrophages. Les macrophages de type pro-inflammatoires libèrent des cytokines telles que le TGF β , TNF α et IL1 β qui sont à l'origine d'altérations profondes du remodelage de la matrice [339]. TGF β induit une augmentation du dépôt matriciel par la promotion de l'expression des gènes de la matrice associée à la diminution de l'expression des MMPs [208]. L'IL1 β régule également l'expression de plusieurs MMPs [408]. Une autre étude a montré que les sécrétions macrophagiques peuvent induire l'expression des collagènes I et III par les pré-adipocytes [117].

- Un autre acteur peut être cité, l'HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor 1- α*), facteur de transcription lié à l'hypoxie. Le rôle de l'hypoxie et de HIF-1 α dans la régulation de l'expression des collagènes a été mis en évidence [255]. Une activation de la synthèse de collagène, (essentiellement le collagène de type I) dans des cellules de muscles lisses péri-artérielles, une accumulation de syndécan-4 dans les cellules de cancer du poumon ou la stimulation de la production de la galectine-1 par l'hypoxie ont été décrits [53, 184, 203]. L'hypoxie facilite également la production de fibronectine dans des fibroblastes et peut affecter les intégrines bêta [194, 247]. De plus, l'hypoxie peut jouer sur les mécanismes de dégradation par la production de MMP [227]. Ces données ont été appuyées par des études *in vivo*. Les souris transgéniques sur-exprimant HIF-1 α dans le tissu adipeux sont croisées à un fond *ob/ob* [140]. Les souris qui en résultent ont une fibrose du tissu adipeux, une infiltration

macrophagique associée à une inflammation locale et une intolérance au glucose. L'un des gènes cibles d'HIF-1 α est la lysyl oxydase, une enzyme qui favorise la rigidification tissulaire en augmentant la cohésion de fibres de la matrice. Le traitement des souris sur-exprimant HIF-1 α par un inhibiteur de la lysyl-oxydase suffit à améliorer la tolérance glucidique, réduire l'infiltration macrophagique et les dépôts de collagène dans ce tissu [140]. L'activation de ce facteur lors de l'expansion du tissu adipeux participerait à la mise en place de l'inflammation et de la fibrose. Ceci est appuyé par d'autres données montrant, chez la souris *C57Bl6*, qu'au début de la prise de poids (induite par un régime hyper-lipidique), l'hypertrophie des adipocytes coïncide avec une augmentation de l'expression d'HIF-1 α , puis de la lysyl-oxydase et de divers collagènes. De plus, chez l'homme, le développement de l'obésité implique également une augmentation de l'expression d'HIF-1 α . De la même façon, un traitement de 8 semaines avec des oligonucléotides anti-sens de HIF1 α chez des souris obèses limite les conséquences métaboliques du régime en induisant notamment une perte de poids [335]. Enfin une étude récente confirme à nouveau ces résultats en utilisant un inhibiteur pharmacologique de HIF1 α : PX-478 ou un mutant de HIF1 α spécifiquement dans le tissu adipeux [353]. Ces dernières données suggèrent que l'inhibition sélective de HIF1 α dans le tissu adipeux puisse être une cible thérapeutique pour limiter les conséquences métaboliques de l'obésité

- ***Conséquences de la fibrose du tissu adipeux***

La fibrose du tissu a différentes conséquences. Il a notamment été observé *in vitro* un lien entre la fibrose et l'inflammation et la résistance à l'insuline de ce tissu. Une étude de culture de cellules adipeuses 3T3 sur gel de polyacrylamide contenant un gradient de densité de « matrice » (collagène I et fibronectine) entraîne une augmentation de la libération de MCP-1 (molécule qui attire les macrophages) et diminue la signalisation insulinaire [216].

In vivo, une souris transgénique *ob/ob* délétée pour le gène codant pour le collagène VI a été créée et étudiée [198]. Ces souris présentent une augmentation de la masse grasse associée à une hypertrophie adipocytaire. En levant une contrainte mécanique, cela pourrait avoir permis l'hypertrophie des adipocytes et l'accumulation des graisses dans le tissu adipeux. De manière surprenante, la perte de ce collagène a amélioré les paramètres métaboliques malgré l'augmentation de la masse grasse. Cette hypertrophie adipocytaire s'est faite sans nécrose cellulaire ni infiltration macrophagique. De ce fait, les lipides ne sont pas accumulés ailleurs, dans le foie, le muscle ou le pancréas limitant ainsi les problèmes métaboliques associés à la

lipotoxicité de ces dépôts ectopiques. Ceci peut expliquer que les animaux soient plus sensibles à l'insuline. Les auteurs suggèrent que la diminution d'expression de TGF β et de la protéine de matrice lumican associée à la surexpression de la décorine (autre protéine de la matrice) induirait une diminution de la fibrose chez ces souris ; cependant il est important de noter que cette délétion du collagène VI n'induit pas une diminution des taux globaux de collagènes analysés en histologie par marquage au rouge sirius ou en dosage hydroxy-proline (dérivé d'acide aminé présent quasi-exclusivement dans la molécule de collagène) [198].

De la même façon, une autre étude a été réalisée chez des souris invalidées totalement pour une autre protéine de la matrice extracellulaire, la thrombospondine 1 [218]. Le modèle d'obésité cette fois n'est plus génétique mais nutritionnel (régime hyper-lipidique). La délétion n'induit pas d'effet sur le poids de l'animal mais, comme le modèle précédent, on observe une moindre infiltration macrophagique et une moindre inflammation (locale et systémique) associée à une amélioration du métabolisme glucidique avec une amélioration de la sensibilité à l'insuline. Malheureusement dans cette étude les auteurs n'ont pas analysé la taille adipocytaire et les dépôts ectopiques de triglycérides.

A l'inverse, de façon cohérente, l'invalidation chez la souris de la métalloprotéase membranaire de type 1 (MT1-MMP), qui induit une augmentation des composants de la matrice, diminue la masse grasse ainsi que la taille adipocytaire [66]. De plus, lorsque des pré-adipocytes MT1-MMP-/- sont mis en culture 3D dans une matrice de collagène, ils ne se différencient pas correctement [161].

L'ensemble de ces études mettent bien en évidence la contrainte mécanique de la matrice extra cellulaire sur l'expansion du tissu adipeux.

Des données de corrélation chez l'homme vont dans le sens d'un lien entre la fibrose du tissu adipeux et la sensibilité à l'insuline [341] en association avec une inflammation du tissu.

Une autre étude montre que dans un KO TIMP2 la fibrose est diminuée (rouge sirius) [183]. Les auteurs expliquent que la délétion de TIMP2 s'accompagne d'une augmentation de l'activité de certaines MMPs ce qui induit la diminution de la fibrose dans le tissu adipeux. Ces souris ont une prise de poids importante liée à une hypertrophie adipocytaire. On comprend comme dans les 2 modèles décrits ci-avant (ob/ob délétées pour le collagène IV et délétion de la thrombospondine 1) qu'en levant la contrainte mécanique de la fibrose, cela a permis l'hypertrophie des adipocytes, mais cette fois cela est lié à une augmentation de l'inflammation dans le tissu adipeux avec une infiltration macrophagique et ceci est associé à une insulino-résistance de l'animal [183].

Le LPA, un médiateur lipidique

I- Les médiateurs lipidiques

I-1 Lipides bioactifs ?

Les lipides sont connus depuis longtemps pour leur rôle structural déterminant dans la constitution des membranes biologiques (phospholipides et cholestérol) et leur rôle fondamental dans le stockage de l'énergie, principalement sous forme de triglycérides. Durant les dernières décennies, les lipides se sont vus reconnaître un rôle de médiateurs capables d'induire différentes activités biologiques et agir en tant que second messenger ou en tant que facteur paracrine voir endocrine.

Ces dernières années, des preuves considérables ont émergé, démontrant que la signalisation lipidique est une composante essentielle de la signalisation cellulaire. La signalisation lipidique peut se produire via l'activation d'une variété de récepteurs, notamment les récepteurs nucléaires mais aussi ceux couplés aux protéines G.

Ces lipides exercent leurs effets en se liant à des récepteurs spécifiques. Ils sont principalement issus de la transformation de lipides membranaires mais ils couvrent toute la gamme des lipides allant de simples acides gras saturés à des molécules complexes telles que celles issues de différents acides gras oméga-3 et oméga-6 et ceux dérivés de la sphingosine.

Classe	Médiateurs lipidiques
Acides gras	Prostaglandines Thromboxane Leucotriènes Lipoxines Protectines Resolvines Acides epoxyeicosatriénoïques Autres acides gras époxydiques
Phospholipides	Facteur d'activation plaquettaire Lipides oxydés
Lysophospholipides	Acide lysophosphatidique Sphingosine-1-phosphate
Autres	2-arachidonyleglycérol Autres lipides amides

Schéma 7:

Médiateurs lipidiques

Issus de [178]

La signalisation des lipides est changée dans une multitude d'états pathologiques, et peut dérégler la fonction des cellules dans le système immunitaire afin de provoquer une inflammation chronique, des réactions auto-immunes et des allergies, contribuer à l'apparition des maladies cardio-vasculaires, ou à promouvoir la croissance de tumeurs. Une modification de certains lipides bioactifs a aussi été détectée dans les maladies dégénératives et métaboliques. Ainsi, de nombreuses stratégies modifiant les lipides sont actuellement à l'étude, notamment dans cette thèse.

I-2 Médiateurs lipidiques, obésité et homéostasie métabolique

Le rôle de certains peptides ou protéines, notamment les adipokines, dans la régulation de l'obésité ou l'homéostasie glucidique est bien établi, mais à côté de ces médiateurs protéiques, les lipides peuvent aussi avoir un rôle très important.

Un nombre croissant de preuves suggère que les médiateurs lipidiques produites localement par les adipocytes et / ou des cellules inflammatoires peuvent, au moins en partie, participer l'adipogenèse, la différenciation adipocytaire et l'apparition des désordres métaboliques associés à l'obésité.

Le tissu adipeux est un tissu qui sécrète des lipides bioactifs. De par sa fonction de stockage, il contient la majorité des acides gras et du cholestérol libre non estérifié dans l'organisme. La mobilisation des substrats énergétiques du tissu adipeux, les triglycérides, par le processus de lipolyse permet la libération d'acides gras, principalement du palmitate et de l'oléate [372]. Cependant, le tissu adipeux est aussi capable de produire et de sécréter des lipides bioactifs permettant une communication intercellulaire au même titre que les peptides qu'il produit, les adipokines (voir partie 3). Le terme « lipokine », permettant de regrouper ces molécules, est apparu en 2008 dans la littérature lors de la mise en évidence de la sécrétion et des effets du C16:1n7palmitoleate [48]. Cependant, le C16:1n7palmitoleate n'est pas le seul lipide bioactif libéré par le tissu adipeux. La sécrétion par les adipocytes d'acide lysophosphatidique (LPA), dont nous reparlerons plus amplement par la suite, a été décrite dès 1998 [381]. Certaines prostaglandines et des endocannabinoïdes, dont PGE2 [93] et l'anandamide [15] sont encore d'autres exemples de lipokines.

La première molécule décrite comme une lipokine, C16:1n7-palmitoleate a un rôle métabolique important. Il augmente l'insulino-sensibilité des muscles, et il diminue l'accumulation ectopique de lipides dans le foie [48].

Dans ce tableau je montre quelques exemples de médiateurs lipidiques, sur ce qui motive ma thèse: le tissu adipeux et les dérégulations métaboliques qui peuvent accompagner son expansion. Je ne parle pas des lipides amenés par l'alimentation qui peuvent pourtant eux aussi jouer un important rôle régulateur dans la mise en place de l'obésité et des maladies métaboliques [256].

Schéma 8 :

Médiateurs lipidiques et obésité

Prostaglandines	
<ul style="list-style-type: none"> • PGE2 	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ lipolyse → ↑ taille adipocytaire → obésité [121; 199] - améliore insulino-sensibilité [199] - transforme tissu adipeux blanc en brun [436] - ↑ production de leptine [92]
<ul style="list-style-type: none"> • PGI2, PGD2, PGJ2 	<ul style="list-style-type: none"> • - ↑ adipogenèse → obésité [137] [240]
<ul style="list-style-type: none"> • PGF2 	<ul style="list-style-type: none"> - in vitro ↓ adipogenèse [56, 119, 371] - in vivo ↑ obésité et améliore insulino-sensibilité [440]
Acide epoxyeicosatrienoïque	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ inflammation du tissu adipeux et améliore le syndrome métabolique [268]
Shingosine	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ dans plasma et tissu adipeux de l'obèse [323] - effet pro-thrombotique et pro-inflammatoire au niveau du tissu adipeux [43]

II- Le LPA, médiateur lipidique

II-1 Structure du LPA

L'acide lysophosphatidique (LPA) est le plus simple des glycérophospholipides naturels. Il est composé d'une molécule de glycérol phosphorylée en position 3 et acylée en position 1 ou en position 2, l'autre fonction alcool restant libre.

On peut trouver *in vivo* différentes formes de LPA. Ces formes dépendent de la nature de l'acide gras, saturé (16:0 ; 18:0) ou insaturé (16:1 ; 18:1 ; 18:2 ; 20:4), de sa position sur le glycérol et du type de liaison (acyl ou alkyl) [29, 280].

II-2 Synthèse du LPA

Le LPA est produit aussi bien au niveau intracellulaire qu'extracellulaire. Il est retrouvé dans de nombreux fluides biologiques. Il a été dosé au niveau sanguin dans le sérum, le plasma, mais aussi dans la salive, le liquide folliculaire, le milieu interstitiel du tissu adipeux, l'humeur aqueuse ou le liquide lacrymal [280]. En raison de sa nature polaire, les échanges entre les compartiments intracellulaire et extracellulaire du LPA semblent peu probables. Il existe pour certains facteurs lipidiques des transporteurs membranaires, mais à ce jour aucun transporteur du LPA n'a été décrit.

- ***Synthèse du LPA intracellulaire***

En intra-cellulaire, le LPA est un intermédiaire dans la biosynthèse des triglycérides et de certains phospholipides. Il est produit lors de l'acylation du glycérol-3-phosphate par la Glycérol-3-Phosphate Acyl-Transférase (GPAT) [72].

- ***Synthèse du LPA extracellulaire***

Au niveau extracellulaire, il existe principalement deux voies de production du LPA chacune pouvant être décomposée en deux étapes.

- Le LPA peut être produit à partir de diacylglycérol ou de phospholipides qui sont convertis en acide phosphatidique (PA) par, respectivement, une diacylglycérol kinase ou une

phospholipase D (PLD). Le PA ainsi produit est ensuite hydrolysé par une phospholipase A2 (PLA2) sécrétée [108] ou par une phospholipase A1 (PLA1) sélective du PA [154, 338]. Cette dernière réaction aboutit à la formation d'un acide gras et d'une molécule de LPA.

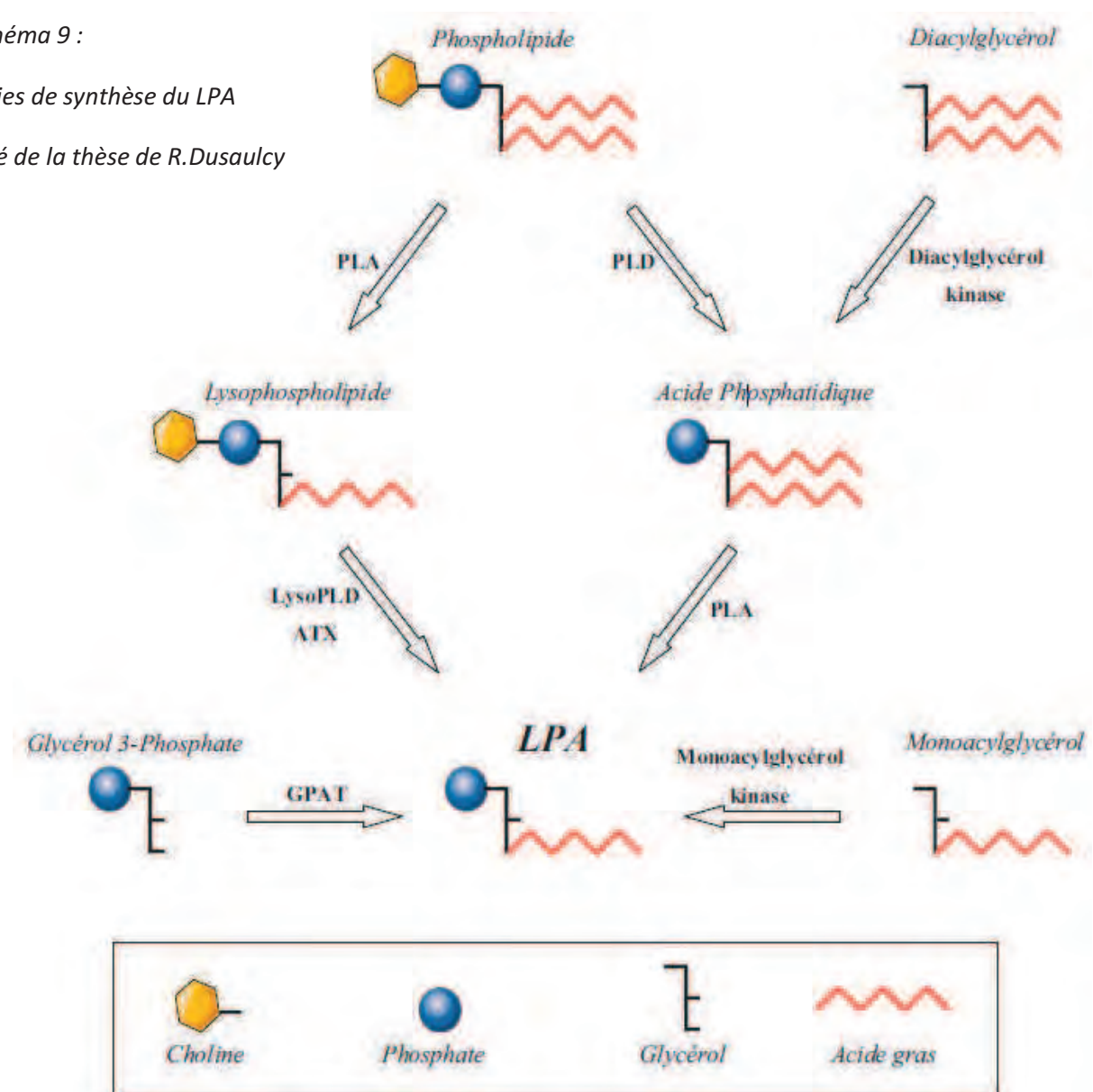
- Dans l'autre, les phospholipides, majoritairement la phosphatidylcholine, sont d'abord convertis en lysophospholipides par l'action d'une PLA1 ou d'une PLA2, puis ces lysophospholipides sont transformés en LPA par une lysophospholipase D (lysoPLD), l'autotaxine (ATX). Cette voie impliquant l'ATX se déroule majoritairement dans les liquides biologiques tels que le sérum ou le plasma [280] (voir chapitre qui suit).

- Une troisième voie de synthèse extracellulaire a récemment été décrite. Elle consiste en une phosphorylation de monoacylglycérol par une monoacylglycérol kinase [27].

Schéma 9 :

Voies de synthèse du LPA

Tiré de la thèse de R.Dusaulcy



▪ Les phospholipases A2 secrétées

Une autre possibilité pour former du LPA est la déacylation de l'acide phosphatidique (PA) par des enzymes de type phospholipase A2 secrétée (sPLA2). Les phospholipases A2 forment une grande famille d'enzymes qui hydrolysent les glycérophospholipides au niveau de la liaison ester en position 2 du glycérol. Actuellement 11 sPLA2 différentes ont été caractérisées ; ce sont de petites protéines entre 13 et 20kDa, excepté pour la sPLA2 III qui avoisine les 55 kDa dû à une extension en N et en carboxy-terminale. Les sPLA2 sont caractérisées par la présence de 6 ponts disulfures extrêmement conservés [44].

Initialement découvertes dans le venin de certains serpents ou scorpions, on retrouve les sPLA2 dans de nombreux fluides biologiques comme les sucs pancréatiques ou le liquide synovial [44, 206, 252]. Les PLA2 vont convertir des phospholipides (principalement la phosphatidylcholine) en lysophospholipides qui seront alors transformés en LPA par l'ATX. Les sPLA2 peuvent aussi produire directement du LPA en hydrolysant le PA, qui est lui-même issu du métabolisme des glycérophospholipides. On trouve ces protéines dans le milieu extracellulaire ou associées au feuillet externe de la membrane plasmique et par conséquent loin du PA qui, lui, est plutôt supposé se trouver dans le feuillet interne de la membrane. Cependant, dans certaines situations où l'asymétrie membranaire est perturbée (apoptose, inflammation, activation des plaquettes) le PA peut être présent dans le feuillet externe de la membrane ou être libéré dans des microvésicules [108, 325].

▪ Les phospholipases A1

Les Phospholipases A1 (PLA1) sont définies par une activité catalytique qui hydrolyse la fonction ester des phospholipides en position 1 du glycérol. Il existe des PLA1 intracellulaires et des PLA1 sécrétées extracellulaires. Parmi les PLA1 extracellulaires, certaines hydrolysent spécifiquement le PA en 2-acyl LPA, il s'agit des PA-PLA1 α appelées aussi Lipase H (LIPH) et PA-PLA1 β ou Lipase I (LIPI) [154, 338].

▪ L'autotaxine

Dans les années 80, Tokumura avait mis en évidence, dans le plasma, une activité lysophospholipase D (LysoPLD) capable de synthétiser du LPA par hydrolyse de la lysophosphatidylcholine (LPC) [368]. Ce n'est que dans les années 2002 que l'autotaxine (ATX) a été identifiée comme la lysoPLD présente dans le plasma et responsable de la

production de LPA [370, 376]. L'ATX appartient à la famille des Ecto-Nucléotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase (ENPP). Cette famille est caractérisée par des activités enzymatiques capables d'hydrolyser les liaisons phosphodiesters de nombreux nucléotides comme l'ATP ou l'ADP. Cependant l'ATX montre des capacités à hydrolyser la lysophosphatidyl choline (LPC) en LPA avec une très forte affinité. La spécificité enzymatique de l'ATX semble être liée à la disponibilité de son substrat. Elle utilise comme substrat majoritaire la LPC, présente en très grande quantité dans le plasma et le sérum (> 100 μ M). Cependant l'ATX ne semble pas discriminer le groupement en position 3 des lysophospholipides et par conséquent est capable d'hydrolyser d'autres substrats lysophospholipidiques tels que la lysophosphatylsérine et la sphingosylphosphorylcholine [364]. L'ATX n'a pas d'activité sur les diacyl-phospholipides. Cette spécificité de l'ATX pour les monoacyl-phospholipides pourrait être due à la poche hydrophobe dans le domaine catalytique dont la taille permettrait le positionnement d'une seule chaîne aliphatique excluant ainsi les diacyl-phospholipides [145]. L'acide gras du substrat lysophospholipide influence l'activité enzymatique. L'ATX hydrolyse préférentiellement certaines formes de lysophosphatidylcholines contenant des acides gras insaturés [260]. Ceci serait, là encore, une conséquence de la présence de la poche hydrophobe dans laquelle se place l'acide gras du substrat [145].

L'ATX est une protéine constitutivement active, mais un des mécanismes pouvant réguler son activité serait une auto-inhibition par son produit : le LPA [385].

Parallèlement, l'ATX est également capable de catalyser la formation de la S1P à partir de sphingosylphosphorylcholine [69]. Cependant, la sphingophosphorylcholine étant présente à de très faibles concentrations dans le plasma, son hydrolyse par l'ATX ne peut pas être à l'origine des taux circulants de S1P [260]. Ceci est confirmé chez les souris hétérozygotes pour l'ATX chez lesquelles les taux de S1P ne sont pas modifiés alors que les taux de LPA sont réduits de moitié [361, 386].

L'ATX est une enzyme soluble de 125 kDa codée par un seul gène présent sur le chromosome 8 chez l'homme et sur le chromosome 15 chez la souris. L'ATX est codée par le gène ENPP2 (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2) qui est exprimé dès le développement embryonnaire. La transcription de ENPP2 dépend de plusieurs facteurs de transcription (notamment NFAT-1 [61], Hoxa13 [405] et v-jun [31]). Il existe 3 variants d'épissage (α , β et γ) [127]. On retrouve l'ATX- α dans le tissu adipeux et le cerveau chez la souris et elle n'est que faiblement exprimée chez l'homme. La forme β est très largement exprimée. Chez la

souris, on la retrouve dans le système nerveux central aussi bien qu'au niveau des tissus périphériques, alors que chez l'homme elle est bien plus exprimée en périphérie. Enfin, la forme γ est une forme faiblement exprimée chez la souris et chez l'homme ; on la retrouve majoritairement dans le cerveau [127].

Contrairement aux autres membres de la famille ENPP, notamment ENPP1 qui s'accumule sur la face extracellulaire de la membrane plasmique à laquelle elle est ancrée [28], l'ATX est sécrétée par exocytose. Elle est d'abord synthétisée sous forme d'une pré-pro-enzyme immature, contenant un peptide signal N-terminal et serait ancrée à la membrane du réticulum endoplasmique par un « core » hydrophobe. Ce modèle de sécrétion de l'ATX est soutenu par les résultats montrant que l'activité d'une signal-peptidase est nécessaire à la sécrétion de l'ATX [302]. De plus, les études récentes sur la structure de l'ATX ont montré que les acides aminés 1 à 35 composant la séquence signal ne sont plus présents sur l'ATX sécrétée [145, 266]. La maturation post-traductionnelle de l'ATX comprend des glycosylations nécessaires à la sécrétion de l'ATX ainsi qu'à son activité [181, 266]. En effet, si l'on bloque cette étape de la maturation par traitement enzymatique, cela entraîne la formation d'ATX non sécrétée et sans activité catalytique. Il existe aussi dans la séquence de l'ATX un site de reconnaissance de la furine. Le clivage de ce site par la furine n'est pas nécessaire à la sécrétion de l'ATX, mais pourrait augmenter son activité. Cependant, une faible proportion de l'ATX sécrétée serait concernée par ce clivage, qui n'influencerait donc pas l'activité lysoPLD globalement sécrétée [180, 302].

L'ATX possède 2 domaines somatomedine-B like (SMB), un domaine comprenant l'activité PLD/phosphodiesterase (PDE) et un domaine nucléase-like. Très récemment deux équipes ont révélé la structure tridimensionnelle de l'ATX [145, 266]. La structure révèle que l'ATX possède un « tunnel » hydrophobe qui permet aux lipides d'accéder au site catalytique. Ce tunnel n'est pas présent dans les autres protéines de la famille ENPP, ce qui expliquerait la propriété unique de l'ATX à utiliser des lipides comme substrat. Par ailleurs, l'ATX interagissant avec la membrane plasmique *via* les domaines SMB, le tunnel pourrait aussi servir à produire du LPA dans l'environnement immédiat de son récepteur [145, 266].

L'ATX est exprimée dans de nombreux tissus. On la retrouve dès les huitième et neuvième jours de développement au niveau de la région rostrale et le tube neural. L'ATX est ensuite fortement exprimée dans le plexus choroïdien, et les reins [260]. A l'âge adulte, l'ATX est exprimée dans de nombreux types cellulaires et tissus [406]: on trouve une importante

quantité d'ARN messagers de l'ATX dans le cerveau, les ovaires, les poumons, les intestins ou les reins.

La surexpression de l'autotaxine entraîne de graves troubles physiologiques, et le KO chez la souris est létal. En effet, des souris ATX-déficientes meurent au stade embryonnaire de 9,5 jours. Ces effets sont dus à un développement du système vasculaire aberrant et une absence de la fermeture du tube neural en corrélation avec une diminution de la prolifération cellulaire et une mort cellulaire accrue [102, 107, 202, 361, 386]. Tout cela révèle un rôle critique de l'autotaxine en physiologie et une action indispensable lors du développement via des effets sur la migration, la prolifération ou l'apoptose cellulaires, avec notamment un rôle angiogénique très important. Le profil d'expression des embryons mutés a révélé un grand nombre de gènes et de voies dysrégulés, parmi eux l'expression du facteur inductible par l'hypoxie 1- α (HIF-1 α) est sévèrement réprimée et semble dépendre de la signalisation ATX/LPA.

Seule, l'invalidation du récepteur LPA4 reproduit en partie les effets de l'absence d'ATX sur le développement embryonnaire, tels que les défauts de vascularisation au cours de l'embryogénèse [350].

L'ATX, majoritairement via la production du LPA, a de nombreuses fonctions qui vont du développement du système cardio-vasculaire et du système nerveux à l'agressivité de certains cancers [146].

Son expression varie dans différentes conditions physiopathologiques; elle est notamment très étudiée dans le développement de nombreux cancers et tumeurs où elle est surexprimée (sein, rein, thyroïde, lymphome de Hodgkin) et où elle semble accroître le caractère invasif et métastatique de certaines tumeurs *via* une production de LPA qui stimule la chimio-attraction, l'angiogenèse, la mobilité cellulaire et donc l'invasion de nouveaux tissus par des cellules cancéreuses [261]. L'ATX est abondamment exprimée dans divers fluides biologiques et peut s'accumuler dans un certain nombre de situations physiopathologiques... En outre, ATX possède des caractéristiques idéales comme un marqueur de diagnostic; elle est très stable et son niveau varie dans une gamme relativement réduite chez les sujets sains [258]. Récemment des tests à haut débit en laboratoire clinique ont été développés pour déterminer la concentration de l'ATX et son activité [258]. Ces études ont mis en évidence une corrélation entre le niveau d'ATX et plusieurs conditions physiopathologiques [258, 398]. La concentration d'ATX est significativement augmentée dans le sérum de patients atteints de

maladies chroniques du foie [258]. Cela peut s'expliquer par un défaut dans le métabolisme hépatique de l'ATX : l'activité sérique de l'ATX est significativement plus élevée chez le rat ayant subi des lésions du foie [398] et les taux plasmatiques d'ATX sont diminués par les récepteurs «scavenger» des cellules endothéliales sinusoidales de foie chez la souris [182]. Fait intéressant, il a été constaté que les taux sériques d'ATX sont plus élevés chez les femmes que chez les hommes [258], et l'activité de l'ATX devient encore plus élevée chez les femmes qui sont enceintes [369]. En revanche, le niveau sérique d'ATX diminue après l'opération chez les patients atteints d'un cancer de la prostate, ce qui refléterait les dommages postopératoires ou l'état nutritionnel [258]. L'expression de l'ATX est augmentée dans le liquide céphalo-rachidien des patients atteints de sclérose en plaques [143], ainsi que dans les synoviocytes de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde [195]. Dans les dépôts adipeux, l'ARNm ATX augmente au cours de la différenciation adipocytaire et est régulé à la hausse chez les souris diabétiques obèses génétiquement (*db/db*) (voir chapitre suivant).

Jusqu'à maintenant, peu d'inhibiteurs de l'ATX ont été caractérisés notamment à cause de l'absence d'information qui subsistait sur la structure 3D de la protéine. Cependant, quelques inhibiteurs, comme le palmitoyl α -bromométhylène phosphonate (BrP-LPA), le NSC 48300 ou le FTY-720, ont été testés. Ils diminuent la croissance tumorale chez la souris, réduisent la motilité de cellules tumorales *in vitro*, ou encore diminuent la progression de métastases [326, 388, 414]. Ces trois inhibiteurs sont efficaces à des concentrations de l'ordre du micromolaire, concentration élevée pour une éventuelle utilisation *in vivo*. Un autre inhibiteur, le S32826, plus prometteur a été mis en évidence par l'équipe de G Ferry [103], il est capable de réduire significativement l'activité de l'ATX à une concentration de l'ordre du nanomolaire. Cette molécule est capable d'inhiber la prolifération de cellules tumorales en culture en inhibant la synthèse de LPA [103]. Récemment des composés dérivés du S32826 ont montré une meilleure inhibition de l'ATX ainsi qu'une meilleure solubilité dans les milieux aqueux, comme le plasma où la molécule a une demi-vie de l'ordre de 10 h [137]. Une nouvelle molécule, le PF-8380 a récemment été démontrée comme étant un bon inhibiteur de l'ATX présentant 2 intérêts majeurs: sa stabilité et son administration par voie orale [126, 344]. Une revue récente [21], s'est intéressée aux différents inhibiteurs de l'ATX et met en avant leurs possibles applications thérapeutiques.

II-3 Dégradation du LPA

Au niveau intracellulaire, le LPA étant un intermédiaire dans la synthèse des triglycérides et de certains phospholipides, il est rapidement transformé en PA par une acylglycerol-3-phosphate acyltransferase (AGPAT) [346] ou en phosphatidyl-glycérol par une lysophospholipase [366].

La demi-vie du LPA plasmatique est d'environ 3 minutes chez la souris [11, 371]. Cette demi-vie courte s'explique par l'existence de mécanismes de dégradation importants. La principale voie de dégradation du LPA extracellulaire correspond à sa déphosphorylation en monoacylglycérol. Cette déphosphorylation est essentiellement catalysée par les enzymes de la famille des lipides-phosphates phosphatase (LPP). Toutefois, des données récentes indiquent que les enzymes de la famille des Epoxyde Hydrolases solubles sont aussi capables de réaliser cette réaction de déphosphorylation.

- ***Les Lipides-Phosphates Phosphatases***

Il existe trois isoformes de LPPs, ce sont des protéines transmembranaires qui déphosphorylent certains phospholipides possédant un phosphate libre: le LPA, le PA, la S1P ou la céramide-1-phosphate [309]. Bien que transmembranaires, ce sont des enzymes qui possèdent une ecto-activité, c'est-à-dire que leur site catalytique se situe à l'extérieur de la cellule ou dans la lumière des compartiments membranaires internes [40]. Du fait de leur activité catalytique envers certains lipides bioactifs comme le LPA ou la S1P, les LPPs influencent certains processus cellulaires comme la prolifération, la survie, l'apoptose, la différenciation ou la migration en régulant la quantité de ces lipides [309]. La LPP1 semble fortement impliquée dans la régulation des taux de LPA puisque chez des souris invalidées pour le gène de la LPP1, la demi-vie du LPA plasmatique est multipliée par quatre pour atteindre 12 minutes, entraînant une augmentation du taux de LPA plasmatique [371]. De plus en dégradant le PA en diacylglycérol, les LPP peuvent diminuer la disponibilité de cet intermédiaire dans la synthèse du LPA, jouant ainsi un rôle supplémentaire dans le contrôle des taux de LPA [324].

- ***Les Epoxyde Hydrolases Solubles (sEH)***

L'sEH a été initialement découverte comme une enzyme capable de dégrader les lipides contenant des époxydes. Si l'on retrouve bien cette activité au côté carboxy-terminal de l'enzyme, elle possède aussi une activité phosphatase côté amino-terminal. Tout récemment, il a été observé par l'équipe de Morisseau, que l'activité phosphatase de la sEH était capable non seulement de dégrader le LPA, mais que cette activité était supérieure aux LPP dans des

études *in vitro* [250]. Ces résultats sont encore très préliminaires, et des études supplémentaires sont nécessaires, mais ceci ouvre une nouvelle possibilité de régulation du LPA et de ses effets cellulaires.

II-4 La signalisation du LPA

Le LPA a d'abord été caractérisé en tant qu'intermédiaire dans la biosynthèse d'autres lipides. Il s'est avéré par la suite que le LPA n'avait pas seulement un rôle de précurseur, mais qu'il était aussi une molécule de signalisation capable d'induire un large panel d'effets cellulaires, à travers l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. Le LPA étant majoritairement extracellulaire, il active des récepteurs pour induire ces effets. Dans le sérum, on le retrouve lié à l'albumine ou à d'autres protéines sanguines telles que la gelsoline [131].

- ***Les récepteurs membranaires du LPA***

Les récepteurs au LPA sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG). A l'heure actuelle 6 RCPG sont reconnus comme étant des récepteurs au LPA [65, 78].

Les récepteurs LPA1, LPA2 et LPA3 appartiennent à la famille EDG (endothelial differentiation gene), comme les récepteurs à la sphingosine-1-phosphate. Les récepteurs LPA4 and LPA6 sont des récepteurs de type purinergiques et LPA5 appartient à la famille des GPR. Mais aujourd'hui 3 autres récepteurs ont été proposés : P2Y5 [292] et P2y10 [251] et GPR35 [279]. D'avantage de validations expérimentales permettrons peut être d'accepter ces nouveaux récepteurs comme récepteurs au LPA.

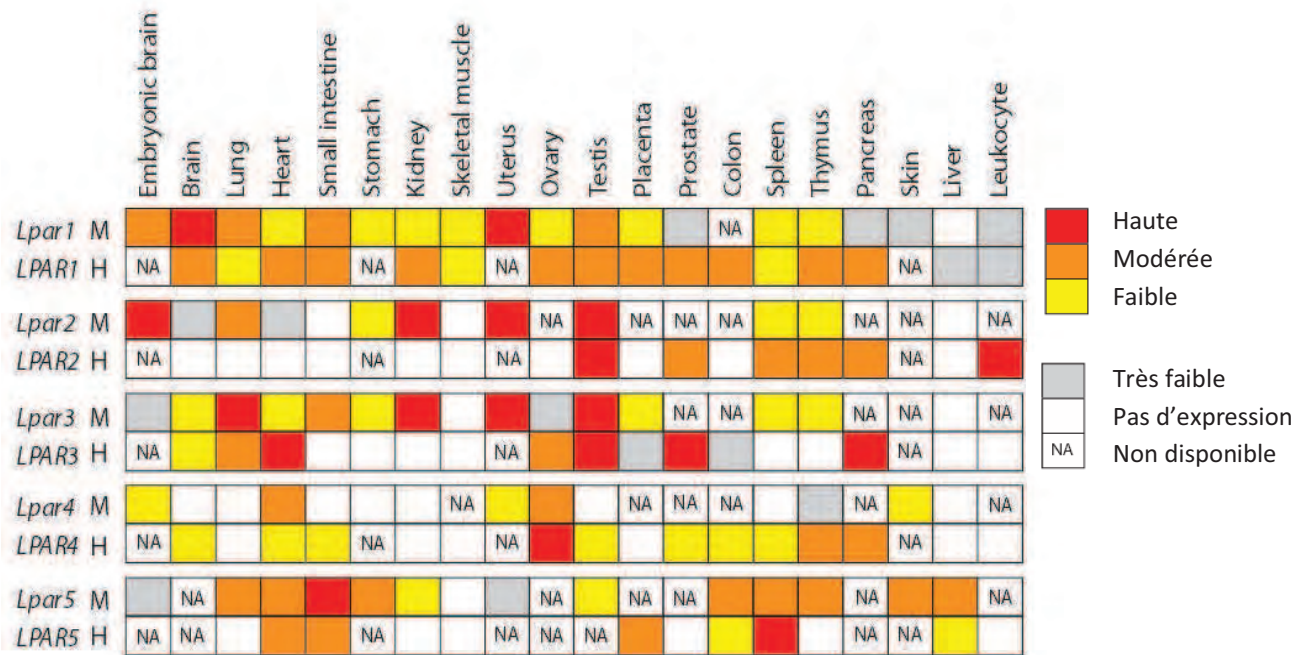
Tous ces récepteurs peuvent se coupler à différentes protéines G (voir schéma).

L'expression de ces récepteurs a été bien décrite chez l'homme et chez la souris, l'établissement de modèles de souris knock-out ou l'utilisation d'antagonistes ont permis de mieux connaître le rôle de ces différents récepteurs. Ces données sont récapitulées dans les 2 tableaux suivants.

Schéma 10: Récepteurs au LPA

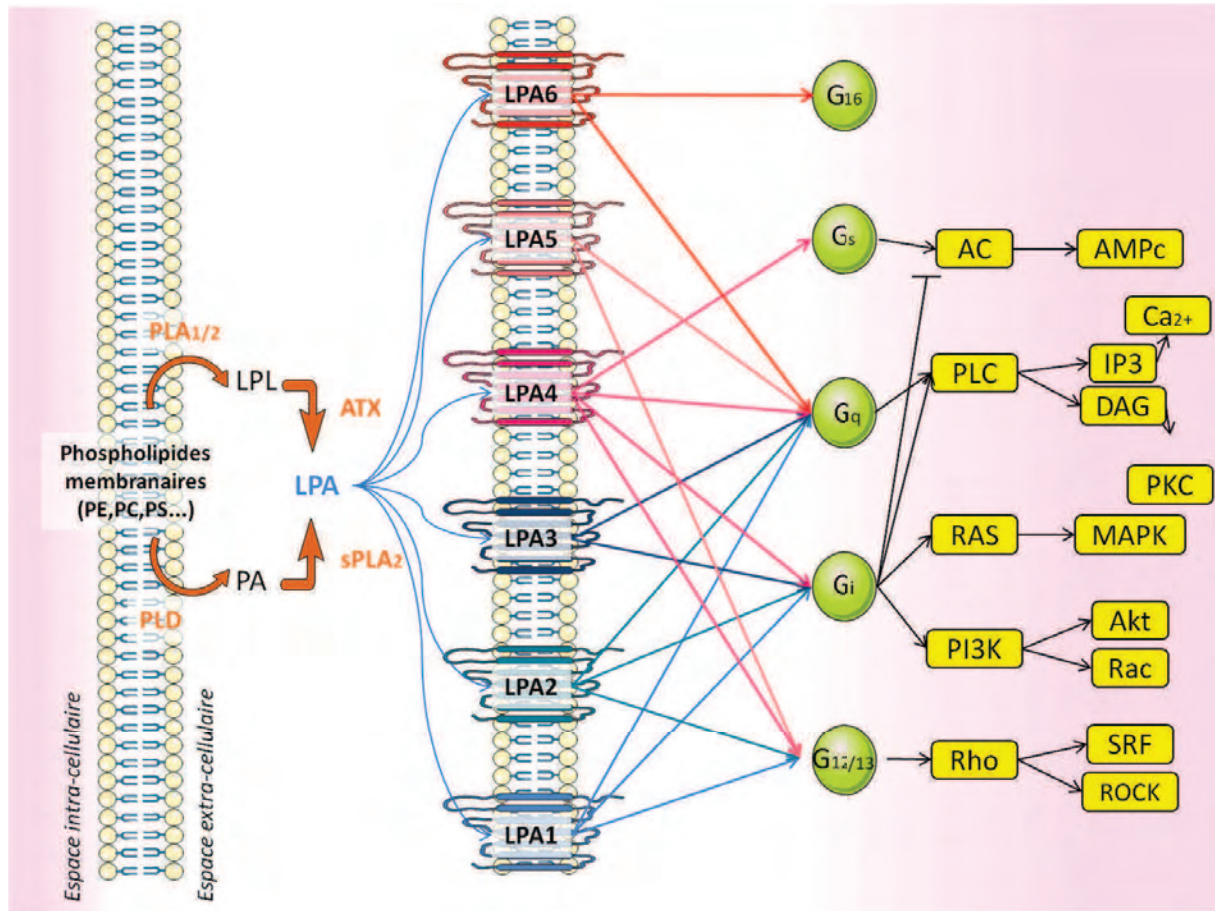
(A) Expression des récepteurs LPA1 à 5LPA dans différents tissus chez la souris (M) et l'homme (M) (issu de [66])

(B) Rôles des différents récepteurs au LPA



Récepteur	Phénotype du KO	Autres implications
LPA1	<ul style="list-style-type: none"> - 50% de mortalité à la naissance [73, 75] - problèmes de développement du système nerveux central [110] 	<ul style="list-style-type: none"> - cancers [297] -fibroses [301] - infertilité [423] -olfaction [110] - mémoire spatiale[110] -anxiété[110] -douleur [172, 173, 175] - dommages hypoxiques [151]
LPA2	<ul style="list-style-type: none"> - pas de phénotype anormal 	<ul style="list-style-type: none"> - cancers [74, 129, 157, 201, 330, 333, 418] -inflammation [432]
LPA3	<ul style="list-style-type: none"> - pas de phénotype anormal 	<ul style="list-style-type: none"> - implantation du blastocyste et espacement des embryons [141, 142, 332, 422]
LPA4	<ul style="list-style-type: none"> - diminution de la viabilité embryonnaire du a un défaut du développement vasculaire (phénotype proche de celui des souris ATX KO) [350] 	<ul style="list-style-type: none"> - migration cellulaire [212]
LPA5	<ul style="list-style-type: none"> - pas de phénotype anormal 	<ul style="list-style-type: none"> - douleur [223]
LPA6	<ul style="list-style-type: none"> - développement de cancers de la vessie [210] 	<ul style="list-style-type: none"> -croissance capillaire [292, 336]

Schéma 11: Signalisation du LPA



• Récepteur intracellulaire

Le peroxyssome proliferator activated receptor- γ (PPAR γ) est un récepteur nucléaire qui, une fois activé, induit la transcription de certains gènes. Dans les années 2004, une équipe a montré par des études *in vitro* que le LPA était capable d'induire l'activation de ce récepteur [242]. Ainsi le LPA exogène active PPAR γ dans des monocytes en culture et stimule l'accumulation de lipides intracellulaires et l'expression de gènes cibles. Cependant, l'idée que le LPA puisse activer le récepteur PPAR γ reste très controversée notamment parce que le LPA extracellulaire est supposé ne pas pouvoir traverser la membrane plasmique pour rentrer dans la cellule. De plus, des travaux de l'équipe démontrent qu'un traitement d'adipocytes de la lignée 3T3F442A par du LPA extracellulaire a un effet anti-adipogénique, donc opposé à l'effet attendu lors d'une activation de PPAR γ , associé à une baisse de l'expression de gènes cibles de PPAR γ [337]. Cependant, une nouvelle étude a pu montrer que le LPA, formé par la GPAT, donc intracellulaire cette fois, était capable d'induire une activation de PPAR γ sur des

cellules de la lignée CHO [346]. Des études plus approfondies seront nécessaires pour établir définitivement le rôle du LPA intracellulaire.

II-5 Pharmacologie du LPA

La plupart des antagonistes des récepteurs au LPA ciblent les récepteurs LPA1 et LPA3. Plus récemment, quelques études ont porté sur des antagonistes du récepteur LPA4, mais ceux-ci ont encore une très faible sélectivité [346]. La majorité de ces molécules ont montré une certaine efficacité *in vitro*, mais peu d'études ont démontré leur action *in vivo* [63]. Parmi les 4 plus utilisés on retrouve :

- **Le Ki16425**

Le Ki16425 est un antagoniste des récepteurs LPA1 et LPA3 et, dans une moindre mesure, du récepteur LPA2. Il inhibe des réponses induites par le LPA sur des cellules en culture ou des explants (cerveau entier ou cortex) telles que la prolifération, la migration ou la rétraction de neurites [228, 269, 278]. Plusieurs études ont démontré l'efficacité du Ki16425 *in vivo* dans différents domaines de recherche. Il diminue la formation de métastases osseuses dans un modèle de xénogreffes de tumeurs mammaires [35]. Un traitement par le Ki16425 réduit la fibrose rénale induite par une obstruction urétérale unilatérale chez la souris [301]. Le Ki16425 bloque aussi la stimulation par le LPA de la sécrétion de prostaglandines par l'utérus chez la vache [407]. Le Ki16425 bloque précocement l'induction de douleurs neuropathiques. Cette dernière étude met cependant en évidence la faible durée de vie du Ki16425 *in vivo* puisqu'il n'est plus actif 90 min après son injection [234]. L'administration dans la trachée de souris de Ki16425 protège de l'effet délétère de l'injection de LPS: diminution de la production d'IL6 dans les fluides de lavages pulmonaires et diminution de l'infiltration de cellules dans l'espace alvéolaire [431]. Une étude très récente montre qu'un traitement de 3 jours au Ki16425 en intra péritonéal améliore les symptômes d'arthrite rhumatoïde chez la souris [282].

- **Le VPC12249**

Le VPC12249, analogue du LPA, est un antagoniste des récepteurs LPA1 et LPA3 [148]. *In vitro* il bloque l'augmentation des taux de calcium induite par le LPA dans une lignée musculaire C2C12. Il a également été montré que, comme le Ki16425, le VPC12249 bloque

la motilité de cellules cancéreuses [417]. Il a été étudié *in vivo* chez la souris où il diminue les conséquences délétères d'une ischémie/re-perfusion du rein [281]. Il a également été étudié dans un modèle de fibrose pulmonaire post-radiation où il améliore les symptômes [120, 415]. La modification chimique du VPC12249 a abouti à la production du VPC32183 dont la spécificité et l'affinité pour les récepteurs sont augmentées [269].

- **L'AM966**

L'AM966 est un antagoniste spécifique du récepteur LPA1. *In vitro*, il inhibe la libération du calcium intracellulaire et bloque l'effet chémo-attractant du LPA sur les fibroblastes humains. *In vivo*, l'AM966 présente une bonne biodisponibilité lorsqu'il est administré par voie orale. Une étude montre qu'il est capable de réduire plusieurs effets dans lesquels le LPA est impliqué tels que l'inflammation, les lésions et la fibrose pulmonaires induites par la bléomycine chez la souris [354].

- **L'AM095**

L'AM095 est lui aussi un antagoniste spécifique du récepteur LPA1. Il inhibe le couplage du récepteur à la sous unité des protéines G dans des cellules CHO sur-exprimant le récepteur LPA1 humain ou murin. Il s'oppose aux effets chémo-attractants du LPA sur plusieurs lignées cellulaires [355]. Chez la souris, *in vivo*, l'AM095 administré par voie orale prévient et traite (effet curatif) la fibrose induite par la bléomycine dans les poumons [54].

II-6 Effets physiologiques et physiopathologiques du LPA

Il est maintenant clairement établi que le LPA n'est pas un simple intermédiaire dans la synthèse des lipides, mais un lipide bioactif. Le LPA a des rôles multiples et est particulièrement étudié dans le domaine du cancer. Dans ce chapitre, je citerai de façon non exhaustive quelques uns des effets du LPA: ses effets sur le tissu adipeux seront plus approfondis dans le chapitre suivant.

- **I-6-1 Prolifération, survie, migration, angiogenèse**

Le LPA permet la prolifération de nombreux types cellulaires. Il permet notamment la prolifération de cellules tumorales ou cancéreuses [246]. Ces cellules ont souvent un pouvoir prolifératif plus important et sont très réceptives au LPA, car elles expriment beaucoup plus

de récepteurs au LPA [387]. De la même manière, le LPA stimule la survie de nombreux types de cellules, qu'elles soient normales ou transformées. Le LPA augmente la survie et peut également inhiber l'apoptose en bloquant l'activité des caspases 3/7 et la protéine pro-apoptotique Bad [315]. Le LPA intervient également dans les phénomènes de migration cellulaire, autant pour le recrutement de cellules du système immunitaire [29] que pour l'invasion de cellules tumorales. Par exemple, le LPA permet l'activation des MAP kinases ERK1/2 et P38 α dans le développement de métastases osseuses [35]. Le LPA augmente aussi la prolifération, la migration et la cohésion de cellules endothéliales ce qui permet la ré-endothélialisation et le maintien de l'intégrité vasculaire de vaisseaux lésés. L'ATX, par exemple, induit la prolifération de cellules endothéliales, et la formation de tubules par des cellules dans du matrigel [261]. On attribue aussi au LPA des propriétés angiogéniques parce qu'il permet la production de VEGF, qui est un puissant facteur pro-angiogénique [320].

- ***1-6-2 Cancers***

Il a été démontré que le LPA est impliqué dans le développement ou la progression de nombreux cancers et tumeurs tels que le cancer des ovaires, de la prostate, du sein, de la thyroïde ou le mélanome [246]. Des études impliquent le LPA et l'ATX à tous les niveaux du processus cancéreux, l'initiation, la croissance tumorale, et la formation de métastases. On trouve des taux très élevés de LPA dans les ascites de cancers ovariens (de 1 à 80 μ M) ou dans les cancers de la prostate. De plus, on observe dans ces cancers une expression beaucoup plus importante de l'ATX [246], ce qui permet d'augmenter les taux de LPA dans les tumeurs. Cette surexpression de l'ATX a été mise en évidence dans de nombreux tissus tumoraux comme le lymphome de Hodgkin, les glioblastomes, le cancer du poumon à petites cellules, les carcinomes rénaux, les carcinomes hépatocellulaires, les cancers du sein et les carcinomes thyroïdiens [260]. On observe aussi une surexpression des récepteurs au LPA dans certaines cellules de cancer ovarien [98]. Le LPA ayant des propriétés mitogéniques et angiogéniques, il permet la croissance des cellules cancéreuses et l'expansion des tumeurs en induisant une hyper-vascularisation. En stimulant la migration cellulaire, le LPA permet la dissémination des tumeurs et donc entraîne l'apparition de métastases [325]. D'autre part, le LPA est un agent anti-apoptotique, ce qui favorise le processus de tumorigénèse. Le LPA apparaît donc comme un marqueur de tumeur [29], en permettant leur progression [254], et est particulièrement étudié comme étant une cible importante dans le développement de thérapies anti-tumorales et anti-cancéreuses.

- ***I-6-3 Inflammation***

Plusieurs exemples soutiennent un rôle anti-inflammatoire du LPA. Une injection de LPA permet de réduire la mortalité, les lésions, et la production de TNF α , engendrées par une injection de lipopolysaccharide. Les voies de signalisation impliquées dans ce phénomène restent controversées. Les récepteurs LPA1 et LPA3 semblent le plus souvent engagés dans cette réponse anti-inflammatoire alors que le rôle de PPAR γ est plus incertain [96, 253]. Cependant, de nombreuses études attribuent aussi un rôle au LPA dans la mise en place d'épisodes inflammatoires. Ainsi, le LPA est impliqué par son effet pro-inflammatoire dans l'asthme et les allergies [29]. Une étude montre que l'expression de l'ATX est augmentée dans les synoviocytes de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, suggérant l'implication de l'ATX dans la pathologie [195]. Une étude récente montre que la stimulation des récepteurs LPA1 et LPA3 par le LPA entraîne le recrutement de leucocytes sur un site inflammatoire *in vivo* chez la souris. Ce recrutement nécessiterait la sécrétion de chémokines telles que CXCL1, IL-6 et IP-10 [430].

Ces effets apparemment contradictoires du LPA sur l'inflammation pourraient être dus au type et à l'état d'activation des cellules immunitaires impliquées dans les différentes réponses étudiées. En effet, des profils d'expression des récepteurs au LPA différents entre ces différentes cellules pourraient en partie expliquer des réponses inflammatoires opposées selon le contexte [130].

- ***I-6-4 Reproduction, développement***

On trouve du LPA en forte concentration dans le liquide folliculaire (20 μ M environ). Il semble être impliqué dans la maturation de l'ovocyte. D'autre part, la présence de LPA au niveau des ovaires permet la fusion membranaire entre l'ovocyte et le spermatozoïde lors de la réaction acrosomale [42]. De plus, le LPA peut induire la COX-2 durant l'implantation, ce qui induit la production de prostaglandines et permet d'augmenter la perméabilité vasculaire, l'adhésion à la paroi utérine et donc facilite l'implantation. Des études ont mis en évidence une augmentation de l'activité lysoPLD au cours de la gestation associée à une surproduction de LPA. En effet, le sérum de femmes enceintes incubé *in vitro* en présence de LPC engendre une plus grande quantité de LPA. De plus, cette activité augmente avec la grossesse, ce qui semble suggérer que le LPA joue un rôle important dans le maintien et le développement de l'embryon [369]. Malgré la présence d'une activité plus élevée *in vitro*, la concentration de LPA sérique est la même, que ce soit chez des femmes enceintes ou pas. Ceci suggère que le

LPA est produit très localement et il est par la suite dégradé rapidement pour éviter d'engendrer des effets périphériques indésirables [369]. Ainsi, il a également été observé dans la brebis gestante, aux stades précoces de la gestation, une augmentation des taux de LPA dans l'utérus. Cette augmentation de LPA est corrélée avec une augmentation de l'activité lysoPLD que l'on retrouve à la fois dans les cellules épithéliales utérines et au niveau de l'œuf fécondé [225]. L'ATX est indispensable au développement embryonnaire. L'inactivation totale du gène ENPP2 est létale au cours des 9ème – 10ème jours de développement chez la souris. Cette létalité serait due à des défauts de vascularisation du sac vitellin, à une formation anormale des lysosomes dans l'endoderme viscéral ainsi qu'à un développement anormal et retardé du système nerveux [260]. L'inactivation du récepteur LPA4 reproduit en partie les effets de l'absence de l'ATX sur le développement embryonnaire, tels que des défauts de vascularisation au cours de l'embryogénèse [350]. D'autres récepteurs au LPA semblent jouer un rôle redondant ou complémentaire dans le développement embryonnaire. En particulier le récepteur LPA1 dont la délétion est responsable d'un mauvais développement du système nerveux central.

Mais la perte du récepteur LPA1 contrairement à l'inactivation de l'ATX n'est pas létale au cours du développement embryonnaire précoce [73].

Les récepteurs aux LPA jouent également un rôle dans ces processus de développement embryonnaire. En effet, l'expression des récepteurs est régulée en fonction des phases de la grossesse. Ainsi, il a été montré chez la brebis au douzième jour de gestation une diminution de l'expression des récepteurs 1 et 3 en comparaison avec des brebis non gestantes. Par contre au 16e jour de gestation, l'expression du récepteur au LPA3 augmente [226] ainsi que chez la truie [188]. Cette modification d'expression engendre des modifications de l'endomètre qui semblent favoriser la nidation de l'œuf et son développement.

- ***1-6-5 Maladies neurologiques***

L'ATX est fortement exprimée par les plexus choroïdiens et retrouvée dans le liquide céphalorachidien. En conditions normales, l'absence apparente de lysophospholipides dans ce milieu ne permettrait pas la production de LPA par l'ATX. Lors de stress inflammatoires ou de lésions, une augmentation de la perméabilité vasculaire entraînerait le passage de lysophospholipides vers le liquide céphalorachidien, ce qui permettrait alors la production de LPA par l'ATX [260].

Plusieurs effets du LPA sur les cellules nerveuses ont été décrits. Le LPA est impliqué dans un processus de démyélinisation démontré chez les souris invalidées pour le récepteur LPA1 [113, 421]. Le LPA peut aussi, par l'activation du récepteur LPA4, inhiber la croissance de neurones et la différenciation de lignées neuronales *in vitro* [260].

Le LPA, ainsi que l'ATX, sont associés à certaines pathologies touchant le système nerveux. Par exemple, l'expression de l'ATX est augmentée dans le cortex frontal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer [375]. On observe aussi une augmentation de l'ATX dans le liquide céphalorachidien de patients atteints de scléroses multiples [29]. Des études montrent l'implication de l'axe ATX/LPA dans des processus neuropathologiques tels que les douleurs neuropathiques. Une lésion nerveuse induit une production de LPA en partie par l'ATX [235]. Le LPA est lui-même responsable de douleurs neuropathiques par un mécanisme impliquant le récepteur LPA1 et la protéine Rho [172, 175]. De plus les animaux hétérozygotes pour l'ATX, qui produisent moins de LPA, sont moins sensibles aux douleurs induites par des lésions neuronales [174]. L'axe ATX-LPA influence aussi le comportement. Des souris invalidées pour le récepteur LPA1 ont une anxiété augmentée, explorent peu leur environnement et présentent une mémoire réduite [56].

- ***I-6-6 Développement osseux***

Des études récentes ont mis en évidence, par l'invalidation des récepteurs LPA1 et 4 chez la souris, que le LPA a un rôle dans le développement du squelette [32].

- ***I-6-7 Maladies cardiovasculaires***

Le LPA semble jouer un rôle protecteur dans des conditions ischémiques. Dans ces conditions, les niveaux de LPA sont élevés et il a été montré qu'ils protègent différents types de cellules de l'apoptose induite par l'hypoxie, y compris les myocytes cardiaques, les cellules souches mésenchymateuses et les cellules rénales [60, 193, 281]. En plus de leur survie, la contractilité des myocytes est également régulée par le LPA [76]. Il supprime le raccourcissement cellulaire induit par l'isoprénaline, par l'activation de LPA1 et/ou LPA3. Il a également été démontré que le LPA augmente l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) dans les myocytes cardiaques, augmentant l'utilisation et le dépôt de lipides, ce qui pourrait conduire à une altération de la contractilité [308]. En dehors du cœur, le LPA induit la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires [9] et élève la pression artérielle chez le

rat [367]. Le LPA peut provoquer l'hyperplasie intinale, l'une des étapes menant à l'athérosclérose. La prolifération *in vitro* et la migration des cellules musculaires lisses sont atténuées dans les souris LPA1/2 déficientes [288].

- ***1-6-8 Processus de cicatrisation et de fibrose***

Le LPA participe à la cicatrisation de nombreux tissus tels que la cornée, l'épithélium gastrique et la peau [19, 348, 412]. Le LPA salivaire semble participer à la réparation des lésions de la partie supérieure du tractus digestif. Il accroît par exemple la prolifération de culture de cellules issues de l'œsophage, du pharynx, ou de la langue. Une application locale de LPA augmente la cicatrisation de blessures cutanées ou la réparation de l'épithélium intestinal [29].

Des études récentes indiquent que le LPA participe de façon importante au processus de cicatrisations aberrantes que sont les fibroses. L'effet pro-fibrotique du LPA a été décrit au niveau de plusieurs types de cellules.

- **Fibrose rénale** L'induction de la fibrose rénale chez le rongeur par une obstruction urétérale unilatérale est accompagnée d'une augmentation de l'expression du récepteur LPA1 et de la production de LPA par le rein [301]. Cette augmentation est aussi observée dans un autre modèle de fibrose rénale chronique induite par un sérum néphrotoxique [303]. Plusieurs faits démontrent l'implication du LPA dans la mise en place de la fibrose rénale. En effet, la fibrose décrite dans le modèle de l'obstruction urétérale unilatérale est significativement réduite chez des souris invalidées pour le récepteur LPA1, et par des traitements par les antagonistes Ki16425 et AM095 [301, 355].

- **Fibrose pulmonaire** Le LPA est aussi un acteur majeur de la fibrose pulmonaire. Il est retrouvé dans le liquide broncho-alvéolaire, où sa concentration augmente lors d'une fibrose induite par la bléomycine chez la souris [357]. Les situations de fibroses pulmonaires semblent aussi accompagnées d'une augmentation de l'expression des récepteurs LPA1 et LPA3 y compris chez l'homme où le récepteur LPA1 est surexprimé dans des fibroblastes issus de patients atteints de fibrose pulmonaire (Revue Tager AM Inflammation and Regeneration vol 33 no2 mars 2013).

Que ce soit par l'utilisation de souris invalidées pour le gène du récepteur LPA1 ou par des traitements avec des agents pharmacologiques AM966 et VPC-12249, antagonistes des récepteurs LPA1 et LPA1 et LPA3 respectivement, l'induction de la fibrose par la bléomycine

ou par des irradiations est réduite [120, 354, 355, 415]. Ceci confirme le rôle majeur de la signalisation du LPA dans cette pathologie. L'effet pro-fibrotique du LPA et de son récepteur LPA1 dans les poumons passerait par une augmentation de la perméabilité vasculaire, et du recrutement de fibroblastes.

- Fibrose artérielle La fibrose artérielle se caractérise par une formation excessive de néointima dans la paroi artérielle, due à l'hyperplasie de cellules musculaires lisses dédifférenciées. Cette dédifférenciation en cellules proches de myofibroblastes productrices de matrice extracellulaire est stimulée *in vitro* par le LPA [147, 204]. *In vivo*, le LPA contenu dans des LDL oxydées serait impliqué dans le surdéveloppement de l'intima [427]. De plus, une lésion de la carotide chez la souris entraîne une augmentation de l'expression des récepteurs LPA1, LPA2 et LPA4 ainsi que de l'ATX. La délétion du récepteur LPA2 chez ces souris diminue la formation excessive d'intima [288]. Chez les souris apoE^{-/-}, modèle courant d'athérogénèse, les récepteurs LPA2 et LPA3 sont aussi surexprimés alors que l'expression du récepteur LPA1 est diminuée en réponse à une lésion vasculaire. Un traitement de ces souris avec du Ki16425 diminue la formation de néointima [349].

- Fibrose hépatique Le LPA et l'ATX semblent aussi impliqués dans la fibrose hépatique. La concentration en LPA est corrélée avec des marqueurs de fibrose hépatique chez l'homme atteint d'hépatite C chronique mais aussi dans des modèles animaux de fibrose induite chimiquement [397, 398]. *In vitro*, le LPA active les myofibroblastes [363] hépatiques et augmente la prolifération et la survie de certaines cellules du foie capables de se différencier en myofibroblastes, les cellules étoilées ou « steleate cells » [167, 168].

-Fibrose cutanée Le blocage génétique et pharmacologique de LPA1 induit une diminution de la fibrose cutanée dans un modèle murin de sclérose dermique induite par la bléomycine [54].

- Fibrose péritonéale De la même façon, le blocage génétique et pharmacologique induit une baisse de la fibrose péritonéale induite par la chlorexidine gluconate [318].

Le LPA et son récepteur LPA1 ont un rôle important dans la mise en place de la fibrose chez la souris au niveau de plusieurs tissus. Etant donné que la fibrose est un processus impliqué dans diverses pathologies, la signalisation LPA/LPA1 apparaît comme une cible potentielle pour de nouveaux traitements pharmaceutiques [170].

Lors de ma thèse, j'ai publié une revue sur les agents pharmaceutiques ciblant le récepteur LPA1 dans une optique de traitement anti-fibrotique, que vous pourrez trouver en annexe [312].

Les effets du LPA pourraient passer par différents phénomènes, qui peuvent s'additionner et semblent différents en fonction des tissus impactés. Parmi ces phénomènes nous pouvons en citer quelques uns. Le LPA favorise la migration, la prolifération et la résistance à l'apoptose des fibroblastes [318, 319, 357]. Il est également capable de stimuler la trans-différenciation de plusieurs types cellulaires en myofibroblastes exprimant le marqueur α -SMA (smooth muscle actin), ce qui constitue une étape déterminante du processus fibrotique. Le LPA favorise aussi l'apoptose des cellules endothéliales [115]. Ces effets du LPA pourraient passer par sa capacité à augmenter l'expression du CTGF (connective tissue growth factor) [120, 139, 152] et dépendrait, dans certains cas, d'une transactivation de TGF β 1 par les intégrines [185, 413]. Cet effet est dépendant de l'activation de G α 12/13 ou G α q, de la voie Rho/Rho-kinase [36, 124, 168], et de l'activation de la PKC par mTOR [121].

III- LPA et tissu adipeux

L'autotaxine est exprimée dans de nombreux types cellulaires et tissus et le LPA est produit et agit au niveau de très nombreux tissus où il participe à différents mécanismes physiopathologiques (cf. chapitre précédent). On retrouve le LPA au niveau du tissu adipeux. Les données concernant la relation LPA/tissu adipeux sont peu nombreuses, et ont surtout été obtenues par mon équipe. Elles mettent en évidence que le LPA est produit par le tissu adipeux, qu'il influence en retour le développement du tissu adipeux, et que si ce développement est excessif, comme en situation d'obésité, la production de LPA peut être augmentée pour réaliser une boucle de rétrocontrôle.

III-1 Le tissu adipeux sécrète de l'ATX et produit du LPA.

Historiquement, la production de LPA par le tissu adipeux a été décrite en 1998 dans l'équipe qui montrait alors la présence de LPA dans des milieux conditionnés issus d'adipocytes isolés ou de dialysats obtenus *in situ* par micro-dialyse de tissu adipeux sous-cutané humain [381]. Puis l'équipe a montré que lorsque des adipocytes murins 3T3F442A ou des explants de tissus adipeux humains étaient mis en culture, les taux de LPA dans le milieu de culture augmentaient avec le temps [125]. C'est alors posée la question du mode de production de ce LPA en extracellulaire. La même étude a décrit que les explants ou les adipocytes sécrétaient aussi une activité de synthèse du LPA (LPA-SA) de type lysoPLD [125]. Cette enzyme a été purifiée et identifiée un an plus tard, toujours dans l'équipe, comme étant l'ATX [101]. Comme vue dans le chapitre précédent, il existe plusieurs formes d'ATX. Dans le tissu adipeux humain et murin, c'est l'ATX- α qui est la plus exprimée [127].

L'ATX et LPA sont donc produits par le tissu adipeux. Comme évoqué précédemment, on retrouve du LPA dans différents fluides corporels et notamment le sang. On peut alors se demander si le tissu adipeux participe aux taux plasmatiques de ce médiateur lipidique, et si ce LPA adipocytaire pourrait alors agir de façon «endocrine» sur d'autres organes, avec une action possible «à distance», à la façon des adipokines comme la leptine décrites partie 3. **Cette question a été abordée dans l'article 1.**



III-2 Le développement excessif du tissu adipeux peut réguler l'axe ATX/LPA

- ***ATX adipocytaire et obésité***

Il a été montré que, dans un modèle génique d'obésité (souris *db/db*, déficientes pour le récepteurs à la leptine), l'ATX était surexprimée dans le tissu adipeux [37, 101]. Néanmoins, dans la même publication il est mis en évidence que cette expression n'est pas augmentée dans 2 autres modèles murins d'obésité: nutritionnel (avec mise en régime gras pendant 8 semaines) ou chimique (par un traitement à l'aurothiogluucose). La différence majeure entre ces trois modèles, c'est que l'obésité y est associée, ou pas, à un diabète (diabète uniquement chez les *db/db*). Ce papier propose alors l'idée suivante: l'expression de l'ATX ne serait pas liée directement à la masse de tissu adipeux mais plutôt au niveau de résistance à l'insuline des adipocytes et/ou à leur statut inflammatoire. D'autant que chez l'homme, il n'y a pas de corrélation entre l'indice de masse corporelle et l'expression de l'ATX dans le tissu adipeux mais que cette expression est significativement augmentée chez des patients présentant une obésité morbide associée à une intolérance au glucose [37]. Cet état nécessite cependant une obésité, car des souris rendues diabétiques par administration de streptozotocine, sans obésité, ne présentent pas de modification de l'ATX [37].

Un régime riche en lipides conduit à l'apparition d'une insulino-résistance chez la souris ; il serait alors intéressant de poursuivre ce régime plus de 8 semaines, pour qu'il entraîne l'apparition d'un état diabétique et voir alors si l'ATX serait surexprimée. **Ceci a été testé au cours de ma thèse dans l'article 1.**

- ***Mécanismes régulant l'ATX adipocytaire***

Les mécanismes qui contrôlent l'expression de l'ATX dans le tissu adipeux n'ont pas été clairement décrits. On peut penser que la stimulation de l'expression de l'ATX soit due à un stress oxydant ou une hypoxie, deux facteurs qui augmentent avec la différenciation adipocytaire. Une étude récente pourrait aller dans ce sens, montrant que dans des cellules de la microglie, le stress oxydant augmente l'expression de l'ATX et que cette augmentation entraîne un effet antioxydant protecteur [18].

L'expression de l'ATX pourrait aussi être modulée par le statut inflammatoire. En effet, comme vu dans la partie 2, le tissu adipeux, en situation d'obésité développe une

inflammation dite «de bas grade», associée avec une infiltration macrophagique et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire. Quelques études pourraient appuyer cette hypothèse. Il a été montré que l'ajout sur des adipocytes en culture, de rosiglitazone [101] ou de prednisolone [351] (2 facteurs aux propriétés anti-inflammatoires), entraînait une diminution de l'expression de l'ATX. Inversement, un traitement au $TNF\alpha$ (facteur pro-inflammatoire) augmente l'expression de l'ATX [37].

Dans tous les cas, le développement de masse grasse conduit à une augmentation de l'axe ATX/LPA. Se pose alors la question de savoir si cette augmentation est une cause ou une conséquence. **Ceci a été étudié au cours de ma thèse, article 1.**



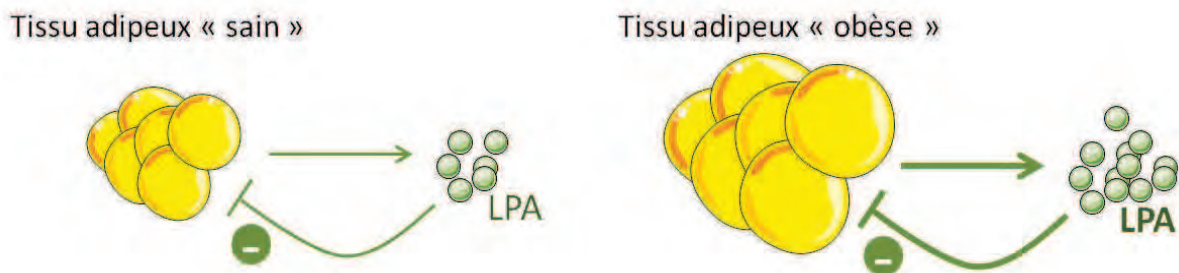
III-3 Le LPA influence le développement du tissu adipeux

Les effets du LPA au sein même du tissu adipeux ont été particulièrement étudiés par l'équipe. Au sein du tissu adipeux, on observe une expression 3 à 5 fois plus importante du LPA1 dans la fraction stroma-vasculaire (contenant les pré-adipocytes) par rapport à celle au niveau des adipocytes [285, 337]. De plus, on observe une down-régulation de LPA1R avec la différenciation adipocytaire [337]. LPA1 est le récepteur au LPA le plus représenté dans le tissu adipeux, chez l'homme et la souris. Les récepteurs LPA2, LPA3 et LPA4 sont, eux, peu exprimés [285, 337]. En opposition à LPA1, l'ATX est exprimée plus fortement dans les adipocytes matures que dans la fraction stroma-vasculaire. Les pré-adipocytes de la lignée murine 3T3F442A, ou issus de cultures primaires n'expriment que très faiblement l'ATX. Cette expression augmente fortement avec la différenciation adipocytaire [101] ce qui semble assez cohérent avec l'augmentation observée en situation d'obésité. Ce même phénomène a également été observé lors de la différenciation adipocytaire de cellules souches embryonnaires de souris [8]. Le pré-adipocyte semble donc être la cible privilégiée du LPA dans le tissu adipeux.

Il a été mis en évidence, *in vitro*, sur des pré-adipocytes 3T3F442A que le LPA augmentait la prolifération de ces cellules [285, 381]. Ces effets ont aussi été décrits, plus récemment, sur des cellules progénitrices de tissu adipeux brun [100, 156].

Le LPA a aussi une action inhibitrice sur la différenciation adipocytaire. Il diminue l'accumulation de triglycérides et l'expression des gènes marqueurs de la différenciation adipocytaire tels que PPAR γ 2 [337]. En 2011, il a été montré que l'effet anti-adipogénique du LPA passait par la voie Rho/ROCK en régulation croisée avec la voie canonique Wnt [215, 270]. Il a été montré que cet effet du LPA passe, au moins en partie, par son action *via* LPA1. Des pré-adipocytes isolés provenant de souris invalidées pour le gène du LPA1 ont, en culture, une plus forte capacité à se différencier en adipocytes que des pré-adipocytes de souris sauvages et sont insensibles à l'effet anti-adipogénique du LPA. Ces souris dépourvues de LPA1, sous régime nutritionnel normal, ont une masse de tissu adipeux plus élevée que les souris contrôles [337], ce qui semble en accord avec un effet anti-adipogénique du LPA *in vivo*.

Si le LPA a un effet anti-adipogénique, il pourrait alors freiner le développement de la masse grasse. Il serait intéressant de tester cette hypothèse en bloquant l'effet LPA lors d'une situation obésogène comme la mise en régime hyper-lipidique, avec par exemple, un blocage pharmacologique de ces LPA1.



Le LPA et le tissu adipeux semblent aujourd'hui clairement partager une relation à double sens qu'il serait intéressant d'étudier plus en détails et notamment en situation d'obésité où les deux sont modifiés. Il semble exister entre eux une boucle de rétrocontrôle. En situation de développement excessif de masse grasse (plus ou moins associée à une insulino-résistance, une inflammation ou une hypoxie...), la production de LPA serait augmentée et constituerait un frein à l'expansion du tissu. Toutefois, augmenter la production de LPA pourrait également conduire à des effets plus délétères comme la fibrose. **Ces points ont été abordés au cours de ma thèse, articles 1, 2 et 3.**

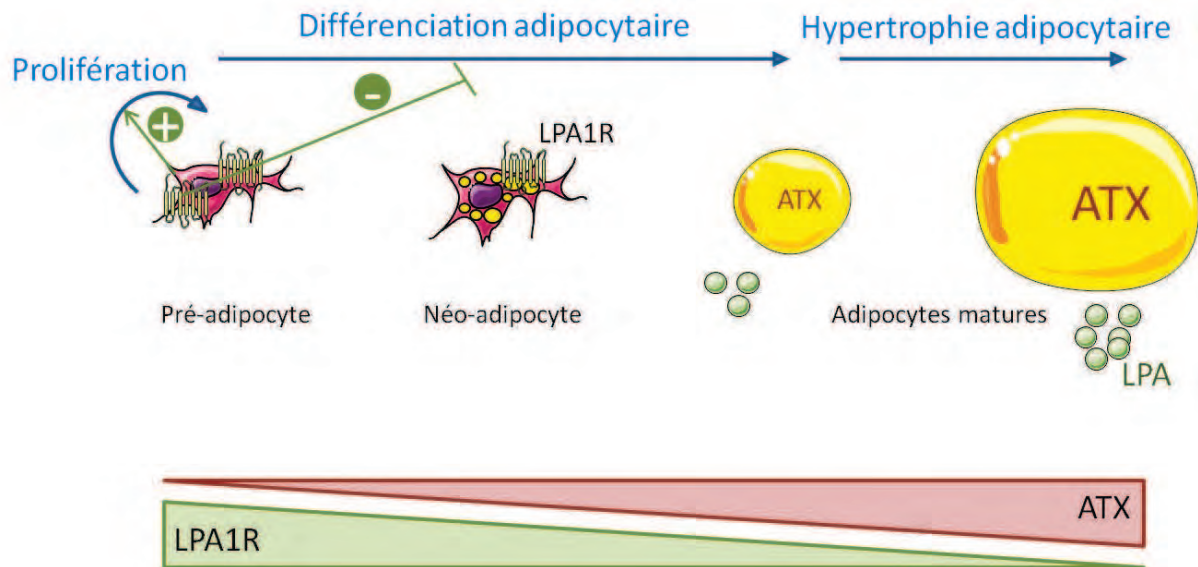


Schéma 12 : LPA et tissu adipeux

Objectifs de la thèse

Les données de la littérature et celles du laboratoire m'ont amené, lors de ma thèse, à étudier, dans un même contexte qu'est l'obésité, trois pans distincts des effets de l'axe ATX/LPA :

- L'expansion du tissu adipeux (résultats 1),
- La mise en place de la gluco-intolérance associée (résultats 2),
- Ainsi que le développement d'une fibrose du tissu adipeux (résultats 3).

Objectif partie 1

Les données concernant l'ATX et le LPA dans le tissu adipeux, essentiellement acquises dans notre équipe, confirment l'importance d'un rapport étroit entre signalisation ATX/LPA -tissu adipeux. Nous l'avons vu, le tissu adipeux est impliqué, d'une part en tant que le lieu d'expression de l'ATX et de synthèse du LPA, et d'autre part, en tant que cible, notamment par l'intermédiaire du récepteur LPA1 exprimé par la fraction stroma vasculaire et les pré-adipocytes. Ceci suggère l'existence d'une action locale paracrine de l'ATX et du LPA dans le tissu adipeux. *In vitro* le LPA est ainsi capable de stimuler la prolifération des pré-adipocytes et d'inhiber leur différenciation en pré-adipocytes. L'invalidation du récepteur LPA1 chez la souris soumise à un régime normal a pour effet d'augmenter sa proportion de masse grasse. De plus, l'ATX dans le tissu adipeux est surexprimée dans les situations d'obésité chez la souris mais aussi chez l'homme.

Se posent alors les questions suivantes : Quel mécanisme est responsable de l'augmentation de la masse grasse des animaux dépourvus de signalisation ATX/LPA ? Quels rôles jouent l'ATX et le LPA dans la physiologie du tissu adipeux chez des animaux soumis à un régime gras obésogène ? La production d'ATX et de LPA par le tissu adipeux influence-t elle les taux plasmatiques de LPA, et qu'en est-il en situation d'obésité ?

Afin de répondre à ces questions, un nouveau modèle de souris transgéniques (FATX-KO) a été mis en place au laboratoire lors de la thèse de Rodolphe Dusaulcy et, au cours de ma

première année de thèse, j'ai participé à sa caractérisation phénotypique. Ceci a donné lieu à un **premier article** présenté ici dans la partie résultats 1.

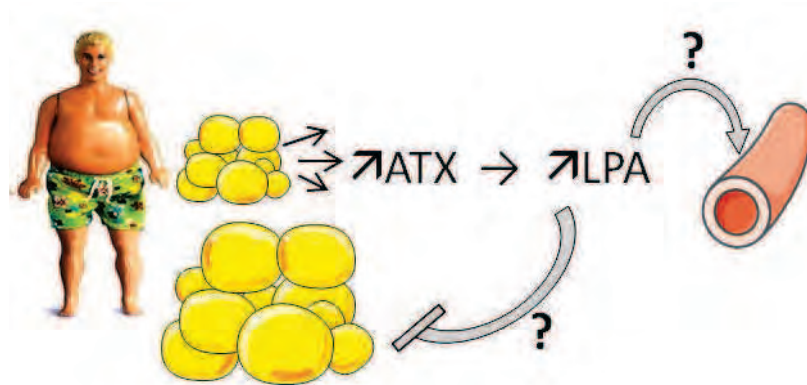


Schéma représentant l'objectif 1 de la thèse

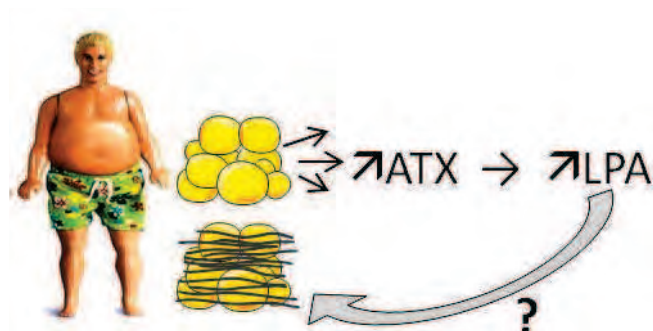
Objectif partie 2

L'ATX, qui est une protéine sécrétée appartient à la famille des adipokines. Nous avons vu qu'en situation d'obésité, il existe des régulations qualitatives et quantitatives des adipokines qui vont agir, positivement ou négativement, sur la mise en place des complications associées à l'obésité, notamment : l'apparition d'une gluco-intolérance. Des données de l'équipe ont mis en évidence que l'augmentation de l'expression de l'ATX au sein du tissu adipeux était en lien étroit avec le statut d'insulino-résistance chez l'homme et chez la souris. Se basant sur cette observation nous avons posé l'hypothèse suivante: l'ATX, surexprimée lors de l'obésité pourrait participer à la mise en place des complications métaboliques associées comme la gluco-intolérance à laquelle je me suis intéressée. Cette étude là a permis la publication d'un **deuxième article** présenté dans la partie résultats 2. Ces résultats appuient l'impact fort de l'axe ATX/LPA dans la gluco-intolérance et l'ensemble de ces données ont été résumées dans une revue: **troisième article**.



*Schéma représentant l'objectif 2 de la thèse***Objectif partie 3**

Le LPA est connu comme un agent pro-fibrosant en agissant sur son récepteur 1 (LPA1), comme cela a par exemple été montré dans l'équipe par Jean Philippe Pradère au niveau rénal [301, 303]. L'état des lieux des connaissances sur les effets pro-fibrosants du LPA et sur les molécules pharmacologiques qui les bloquent (ciblant le LPA1) ont été rassemblés dans une revue : **quatrième article**. En situation d'obésité, les phénomènes de fibroses sont augmentés dans de nombreux tissus (foie, reins, cœur, vaisseaux, pancréas, muscles etc) et participent à l'apparition de pathologies associées : cirrhose hépatique, néphropathies, cardiomyopathies, athérosclérose etc. Récemment, la fibrose du tissu adipeux a été mise en évidence. Au sein du tissu adipeux, l'augmentation de l'expression de l'ATX suggère que la production augmentée de LPA puisse agir, de façon paracrine sur la mise en place de la fibrose du tissu adipeux qui apparaît lors de l'obésité. Ce dernier axe d'étude a permis l'élaboration d'un manuscrit, **cinquième article**, qui a été récemment soumis à publication, et qui figure dans la partie résultats 3.

*Schéma représentant l'objectif 3 de la thèse***Objectif partie 4**

En parallèle, j'ai mené une étude rassemblant des données chez l'homme pour affiner nos connaissances sur l'expression de l'ATX en situation d'obésité (**sixième article**).

Résultats 1 : ATX/LPA et Obésité

I- Contexte bibliographique et projet

L'axe ATX/LPA et le tissu adipeux semblent aujourd'hui clairement partager une relation à double sens que nous avons décidé d'étudier plus en détails et notamment en situation d'obésité où les deux sont modifiés. Les données acquises jusqu'ici semblent indiquer qu'il existe entre eux une boucle de rétrocontrôle: **en situation de développement excessif de masse grasse, la production de LPA serait augmentée, ce qui pourrait contribuer à freiner l'expansion du tissu.** C'est la question à laquelle nous avons tenté de répondre dans cette partie.

Si *in vitro* il avait été mis en évidence que le LPA avait un effet anti-adipogénique, ces données demandaient à être testé *in vivo*. Pour répondre à cette question l'équipe avait mis en place une première stratégie visant à bloquer l'axe ATX/LPA dans un modèle obésogène. L'équipe a créé des souris invalidées spécifiquement pour le gène de l'ATX dans les adipocytes grâce à l'expression de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur aP2. Un tel modèle permet d'étudier l'impact de la perte de production de LPA au sein du tissu adipeux sur le développement de la masse grasse et sur les taux plasmatiques de LPA. Ces souris ont été soumises à un régime gras afin d'étudier le rôle de l'ATX au cours de l'obésité **(Premier article)**.

Nous avons par la suite mis en place un protocole de traitement pharmacologique pour voir si les effets observés étaient dépendants des récepteurs au LPA **(Protocole complémentaire 1 dont une partie a été publiée dans le second article)**.

II- Article 1

Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid.

Dusaulcy R, **Rancoule C**, Grès S, Wanecq E, Colom A, Guigné C, van Meeteren LA, Moolenaar WH, Valet P, Saulnier-Blache JS.

J Lipid Res. 2011 Jun;52(6):1247-55.

Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid

Rodolphe Dusaucy,^{*,†} Chloé Rancoule,^{*,†} Sandra Grès,^{*,†} Estelle Wanecq,^{*,†} André Colom,^{*,†} Charlotte Guigné,^{*,†} Laurens A. van Meeteren,[§] Wouter H. Moolenaar,[§] Philippe Valet,^{*,†} and Jean Sébastien Saulnier-Blache^{1,*,†}

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1048,^{*} Toulouse, Cedex 4, France; Université de Toulouse, UPS, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil,[†] IFR150, BP84225, Toulouse, France; and Division of Cell Biology and Center for Biomedical Genetics,[§] The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands

Abstract Autotaxin (ATX) is a secreted lysophospholipase D that generates the lipid mediator lysophosphatidic acid (LPA). ATX is secreted by adipose tissue and its expression is enhanced in obese/insulin-resistant individuals. Here, we analyzed the specific contribution of adipose-ATX to fat expansion associated with nutritional obesity and its consequences on plasma LPA levels. We established ATX^{F/F}/aP2-Cre (FATX-KO) transgenic mice carrying a null ATX allele specifically in adipose tissue. FATX-KO mice and their control littermates were fed either a normal or a high-fat diet (HFD) (45% fat) for 13 weeks. FATX-KO mice showed a strong decrease (up to 90%) in ATX expression in white and brown adipose tissue, but not in other ATX-expressing organs. This was associated with a 38% reduction in plasma LPA levels. When fed an HFD, FATX-KO mice showed a higher fat mass and a higher adipocyte size than control mice although food intake was unchanged. This was associated with increased expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ 2 and of PPAR-sensitive genes (aP2, adiponectin, leptin, glut-1) in subcutaneous white adipose tissue, as well as in an increased tolerance to glucose. **These results show that adipose-ATX is a negative regulator of fat mass expansion in response to an HFD and contributes to plasma LPA levels.**—Dusaucy, R., C. Rancoule, S. Grès, E. Wanecq, A. Colom, C. Guigné, L. A. van Meeteren, W. H. Moolenaar, P. Valet, and J. S. Saulnier-Blache. **Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid.** *J. Lipid Res.* 2011. 52: 1247–1255.

Supplementary key words adipocyte • high-fat diet • obesity

This work was supported by grants from the INSERM, the Fondation pour la Recherche Médicale (grant # DRM20101220459), and the Dutch Cancer Society. R. Dusaucy and C. Rancoule were supported by a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie (France).

Manuscript received 23 February 2011.

Published, JLR Papers in Press, March 18, 2011
DOI 10.1194/jlr.M014985

Copyright © 2011 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

This article is available online at <http://www.jlr.org>

Autotaxin (ATX) is a secreted lysophospholipase D that catalyzes the hydrolysis of lysophosphatidylcholine into lysophosphatidic acid (LPA), a growth factor-like lipid mediator acting via specific G-protein coupled receptors (1–3). ATX is present in plasma and other biological fluids and is expressed by several organs and tissues but the tissue origin of circulating LPA remains unknown. ATX plays a crucial role in embryonic development because its knockout in mice is lethal due to impaired blood vessel formation and a failure of neural tube closure (4–6).

So far, ATX has mostly been studied for its role in tumorigenesis, angiogenesis, and metastasis (7). Our group has brought ATX into the area of metabolic diseases. We have shown that ATX is abundantly expressed and secreted by adipocytes (8–10) and is responsible for the production of LPA in adipose tissue extracellular medium (11). Nevertheless, the specific contribution of adipose-ATX to circulating LPA remains unknown. ATX expression is increased in adipose tissue from obese/insulin-resistant mice and humans (9, 12). In vitro, ATX expression and secretion increase during the differentiation of preadipocytes into adipocytes (adipogenesis) (8, 9). These observations suggested that ATX contributes to fat development in obesity and associated pathologies. In the present study, we set out to disrupt ATX expression specifically in mouse adipose tissue to examine whether fat mass and plasma LPA concentration were affected. We demonstrate that adipocyte-specific disruption of ATX significantly increases the sensitivity of adipose tissue to expand in response to a high-fat diet (HFD) and directly influences plasma LPA levels.

Abbreviations: ATX, autotaxin; FATX-KO, ATX^{F/F}/aP2-Cre; HFD, high-fat diet; LPA, lysophosphatidic acid; ND, normal diet; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor.

¹To whom correspondence should be addressed.
e-mail: Jean-Sebastien.Saulnier-Blache@inserm.fr



Fig. 1. Schematic representation of cre-mediated recombination of the floxed-ATX gene. Adapted from (4).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Animals were handled in accordance with the principles and guidelines established by the National Institute of Medical Research (INSERM) and were in conformity with the Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals. The local Animal facility committee of INSERM approved our protocols. Mice were housed conventionally under a constant temperature (20–22°C) and humidity (50–60%) and with a 12/12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM) and free access to food and water. The animals were fed either a normal diet (ND) [2900 kcal/kg: 16% protein, 81% carbohydrate, and 3% fat (SAFE, Augy, France)] or an HFD [4730 kcal/kg: 20% protein, 35% carbohydrate, and 45% fat (Research Diet, France)]. When the HFD was applied, it started at the age of 10 weeks for 13 weeks. Fat and lean mass was measured using dual-energy X-ray absorptiometry (EchoMRI-100TM, Echo Medical System, Houston, TX) in accordance with the manufacturer's instructions.

Establishment of $ATX^{F/F}$ /aP2-Cre mice

$ATX^{F/F}$ (FVB genetic background) mice carrying a conditional ATX deleted allele in which exons 6 and 7 (encoding for the catalytic site of ATX) are flanked by two loxP sites were previously described (4). aP2-Cre mice (B6 genetic background) (Jackson Laboratory) carry a Cre transgene driven by promoter sequences from the fatty acid binding protein 4, a gene predominantly expressed in adipocytes (13). $ATX^{F/F}$ mice were mated to aP2-Cre mice and offspring were genotyped in order to select mice bearing both $ATX^{F/F}$ and aP2-Cre alleles (Fig. 1). $ATX^{F/F}$ /aP2-Cre (FATX-KO) mice were compared with control $ATX^{F/F}$ littermates of the same generation.

Genotyping

Genotyping was performed by PCR on tail-tip DNA. The presence of the $ATX^{F/F}$ allele was determined by using the primers P583 (5'-TGCTTGAAGTGTGTGCAC-3') and P584 (5'-TTGAATCTGAGCAATATGG-3') yielding 170 bp and 300 bp products for the wild-type and the floxed alleles, respectively (Fig. 1). Cycling conditions were: 34 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 30 s.

The presence of the aP2-Cre allele was determined using the primers C001 (5'-ACCAGCCAGCTATCAACTCG-3') and C002 (5'-TTACATTGGTCCAGCCACC-3') yielding a 192 bp product. An internal PCR control targeting interleukin-2 gene was performed with primers C003 (5'-CTAGGCCACAGAATTGAAA-GATCT-3') and C004 (5'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCA-TCC-3') yielding a 324 bp product. Cycling conditions were: 35 cycles of 94°C for 1 min, 60°C for 2 min, and 72°C for 1 min.

Adipose cell fractioning

Immediately after dissection, adipose tissue was minced and incubated for 30 min at 37°C under shaking in 5 ml of Krebs-Ringer buffer supplemented with 1 mg/ml collagenase, 3.5 g/100 ml bovine serum albumin, and 22 mg/100 ml pyruvate. Digested tissue was filtered through a 150 μ m screen and floating adipocytes were separated from infranatant, which was centrifuged at 900 g for 20 min in order to get stroma-vascular cells (preadipocytes, endothelial cells, and macrophages) in the pellet.

mRNA quantification

Total RNAs were extracted from tissues and cells using the RNeasy mini kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany). Total RNA (500 ng) was reverse-transcribed for 60 min at 37°C using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) in the presence of random hexamers. A minus RT reaction was performed in parallel

TABLE 1. Sequence of the oligonucleotide primer sets used in RT-PCR analysis

Target genes	Primer sequence 5' to 3'	
	Sense	Antisense
ATX 6-7	TCCGTGCATCGTACATGAAGA	CAGGACCGCAGTTTCTCAATG
ATX 1-2	TGTTTCGGGTGCATACCAGGTAAT	TCGACTTGCTGTGAATCCTAAGC
PPAR γ 2	CTGTTTATGCTGTTATGGGTGAAA	GCACCATGCTCTGGGTCAA
FABP4 (aP2)	TTCCGATGAAATCACCGCAGA	GGTCGACTTCCATCCCACCTT
CD11b	TCCGACGAGTTCGGGATTC	TGTGATCTTGGGCTAGGGTTTC
F4/80	TGACAACGACGCGCTTGTG	GCAGGCGAGGAAAAGATAGTGT
CD31	GTCGTCCATGTCCCGAGAA	GCACAGGACTCTCGCAATCC
Adiponectin	TGGAATGACAGGAGCTGAAGG	TATAAGCGGCTTCTCCAGGCT
Leptin	GGGCTTCACCCCATCTGA	TGGCTATCTGCAGCACATTTG
Glut-1	GGTGTGCAGCAGCCTGTGT	CACAGTGAAGGCCGTGTTGA
Glut-4	CCGGATTCCATCCACAAG	CATGCCACCCACAGAGAAGA
LPL	TTATCCCAATGGAGGCATTTTC	CACGTCTCCGAGTCTCTCTCT
FAS	ATCCTGGAACGAGAACACGATCT	AGAGACGTGTCACTCCTGGACTT
UCP1	CCTGCCTCTCTCGGAAACAA	TGTAGGCTGCCAATGAACA
CD45	ACATGCTGCCAATGGTTCTG	GTCCCACATGACTCCTTCTCTATG
PGC1 α	AAAGGATGCGCTCTCGTTCA	GGAATATGGTGATCGGGAACA

ATX, autotaxin; PPAR, peroxisome proliferator activated receptor; FABP, fatty acid binding protein; CD, cluster of differentiation molecule; F4/80, EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1; Glut, glucose transporter; LPL, lipoprotein lipase; FAS, fatty acid synthase; UCP, uncoupling protein; PGC, peroxisome proliferator-activated receptor γ , coactivator.

to ensure the absence of genomic DNA contamination. Real-time PCR was performed starting with 12.5 ng cDNA and 100 to 900 nM specific oligonucleotide primers in a final volume of 20 μ l using the Mesa blue QPCR Master Mix for Sybr (Eurogentec). Fluorescence was monitored and analyzed in a StepOnePlus Real-Time PCR system instrument (Applied Biosystems). Analysis of the 18S rRNA was performed in parallel using the RRNA

control Taqman Assay Kit (Applied Biosystem) in order to normalize gene expression levels. Results are expressed as follows: $2^{-(Ct18S-Ctgene)}$ where Ct corresponds to the number of cycles needed to generate a fluorescent signal above a predefined threshold. Oligonucleotide primers were designed using the Primer Express software (Applied Biosystems). The sequence of the oligonucleotide primers is listed in **Table 1**.

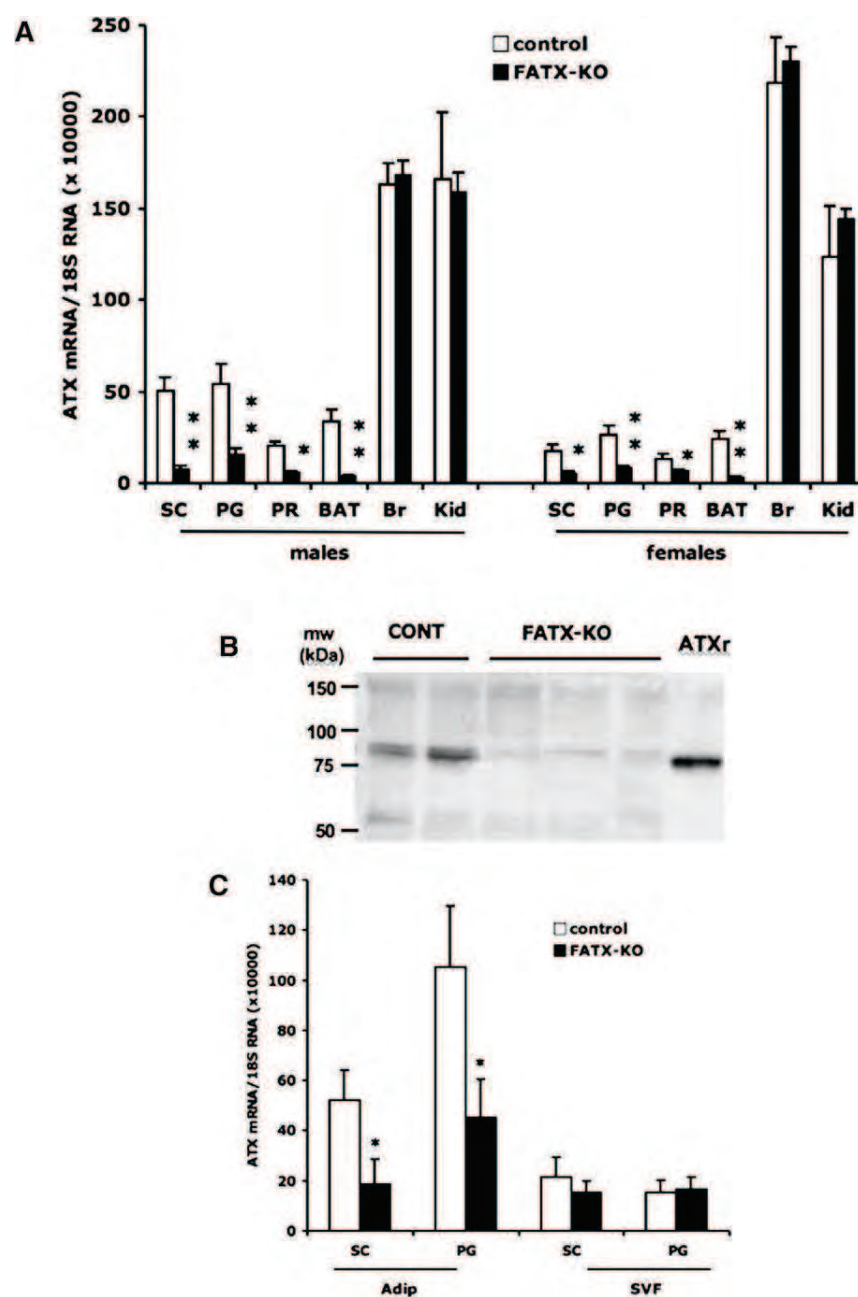


Fig. 2. Adipose-specific disruption of ATX. **A:** ATX mRNAs were quantified in subcutaneous (SC), perigonadal (PG), perirenal (PR) white adipose tissue, brown adipose tissue (BAT), brain, and kidney from control (8 males, 4 females) and FATX-KO (14 males, 17 females) mice fed a normal diet. Values are means \pm SEM. **B:** ATX protein was detected by Western blot in subcutaneous white adipose tissue from 23 weeks old control (CONT, $n = 2$) and FATX-KO ($n = 3$) male mice. Recombinant mouse ATX (ATXr) expressed in Sf9-cells was used in parallel as a control. **C:** ATX mRNAs were quantified in the adipocyte (Adip) and the stroma-vascular (SVF) fractions isolated from the SC and PG white adipose tissue of control ($n = 3$) and FATX-KO ($n = 4$) male mice fed a normal diet. Values are means \pm SEM. A Student's *t*-test was used to compare control with FATX-KO mice: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Western blot analysis

Thirty micrograms of protein from concentrated conditioned medium were separated on a Gel CRITERION 4-12% (Biorad) and transferred on nitrocellulose membrane. The blot was preincubated for 1 h at room temperature in TBS/Tween 0.1% containing 5% dry milk and overnight at 4°C in the same solution supplemented with 0.7 µg/ml ATX-antibody. After washing in PBS/Tween 0.1%, ATX was visualized by enhanced chemiluminescence detection system (ECL, Amersham Biosciences) using an anti rabbit-HRP antibody (SIGMA). ATX-peptide (573-KNKLEELNKRLHT-KGS-588) antibody was purchased from Cayman Chemical.

Adipocyte cellularity measurement

Immediately after dissection, perigonadal and subcutaneous fat pads were fixed in ethanol 95% for 48 h, embedded in paraffin, and prepared on hematoxylin and eosin stained slides. Three nonoverlapping fields (300 to 1500 adipocytes) were captured with an analogic camera (Nikon DXM1200F) connected to a microscope (Nikon Eclipse TE2000-U). Adipocytes areas were measured with Lucia G software (Laboratory Imaging) and theoretical mean diameter was determined as $2\sqrt{(\text{area}/\pi)}$. Adipocyte number per fat pad was determined as previously described (14) using the following formula: $\text{FPW} \times 10^6 / [(4 \times \pi R^3/3)/1000] \times 0.95$ with FPW (fat pad weight) in mg and R (radius) in µm.

Glucose tolerance test

Blood glucose concentrations were monitored with a glucose meter (Roche Diagnostic, Grenoble, France) at -30, 0, 30, 60, 90, and 120 min after gavage of fasting mice (6 h) with glucose (3 g/kg body weight).

Quantification of plasma LPA

LPA was quantified using a radioenzymatic assay as previously described (15). Briefly, lipids were extracted from conditioned media or plasma with an equal volume of 1-butanol and evaporated. Extracted lipids were converted into [^{14}C] PA with recombinant LPA acyl-transferase in the presence of [^{14}C] oleoyl-CoA. The products of the reaction were extracted, separated by one-dimensional TLC, and autoradiographed.

Statistics

Results are means \pm SE. Student's *t*-test was used to compare two groups of data.

RESULTS

Adipose-specific disruption of ATX

ATX mRNAs were quantified using a set of oligonucleotide primers directed against exons 6 and 7, which are

expected to be deleted after Cre-mediated recombination. When compared with their control littermates, FATX-KO mice exhibited a strong reduction (70 to 90% depending on fat depot) in ATX mRNA in perigonadal, subcutaneous, and perirenal white adipose tissue as well as in brown fat tissue (Fig. 2A). No significant change in ATX mRNA was observed in brain and kidney (Fig. 2A). Similar results were obtained in both males and females (Fig. 2A). Adipose-specific disruption of ATX mRNA was also observed when using another set of PCR primers directed against exons 1 and 2, which are out of the lox site framing (not shown), suggesting that cre-mediated recombination of exons 6 and 7 led to the complete loss of the whole ATX mRNA. This was confirmed using Western blot analysis that revealed a strong reduction in the amount of ATX protein in white adipose tissue of FATX-KO mice when compared with control mice (Fig. 2B). In white adipose tissue from control mice, ATX mRNA expression was higher in the adipocyte than in the stroma-vascular fraction (Fig. 2C). In FATX-KO mice, the disruption of ATX expression was observed in the adipocyte but not in the stroma-vascular fraction when compared with control mice (Fig. 2C). These results demonstrated that in FATX-KO mice possessed an adipocyte-specific disruption of ATX expression.

Adipose-specific disruption of ATX enhances white adipose tissue expansion in response to HFD

Under ND, FATX-KO mice (males and females) showed no significant change in body weight, adipose tissue (white and brown) mass, or in the weight of other organs (liver, kidney, heart, brain, and skeletal muscles) when compared with control mice (not shown). These results show that under ND, adipose-specific disruption of ATX does not affect the normal development of white and brown adipose tissue.

Under HFD, total body weight and the weight of other organs remained unchanged between control and FATX-KO males (Table 2 and Fig. 3A). In females, a tendency of increase ($P = 0.076$) in total body weight was observed in FATX-KO when compared with control mice (Table 2). In parallel, a significantly higher weight of the three white adipose tissue depots as well as of brown adipose tissue was observed in FATX-KO when compared with control mice (Fig. 3A). This phenotype was particularly pronounced in females, (Fig. 3A). Analysis of body composition using

TABLE 2. Body weight and glycemia

			n	Body weight (g)	Plasma glucose (g/l)
Females	Normal diet	control	4	29.8 \pm 2.5	0.85 \pm 0.07
		FATX-KO	19	27.4 \pm 1.9	1.03 \pm 0.03
	High-fat diet	control	7	30.7 \pm 2.4	1.14 \pm 0.11
		FATX-KO	16	36.1 \pm 2.9 ^(0.076)	1.27 \pm 0.07
Males	Normal diet	control	8	32.3 \pm 1.7	1.28 \pm 0.16
		FATX-KO	14	34.2 \pm 1.8	1.05 \pm 0.07
	High-fat diet	control	6	45.2 \pm 2.9	1.43 \pm 0.13
		FATX-KO	15	47.6 \pm 1.9	1.54 \pm 0.13

Plasma glucose was determined after overnight fasting (*P*-value).

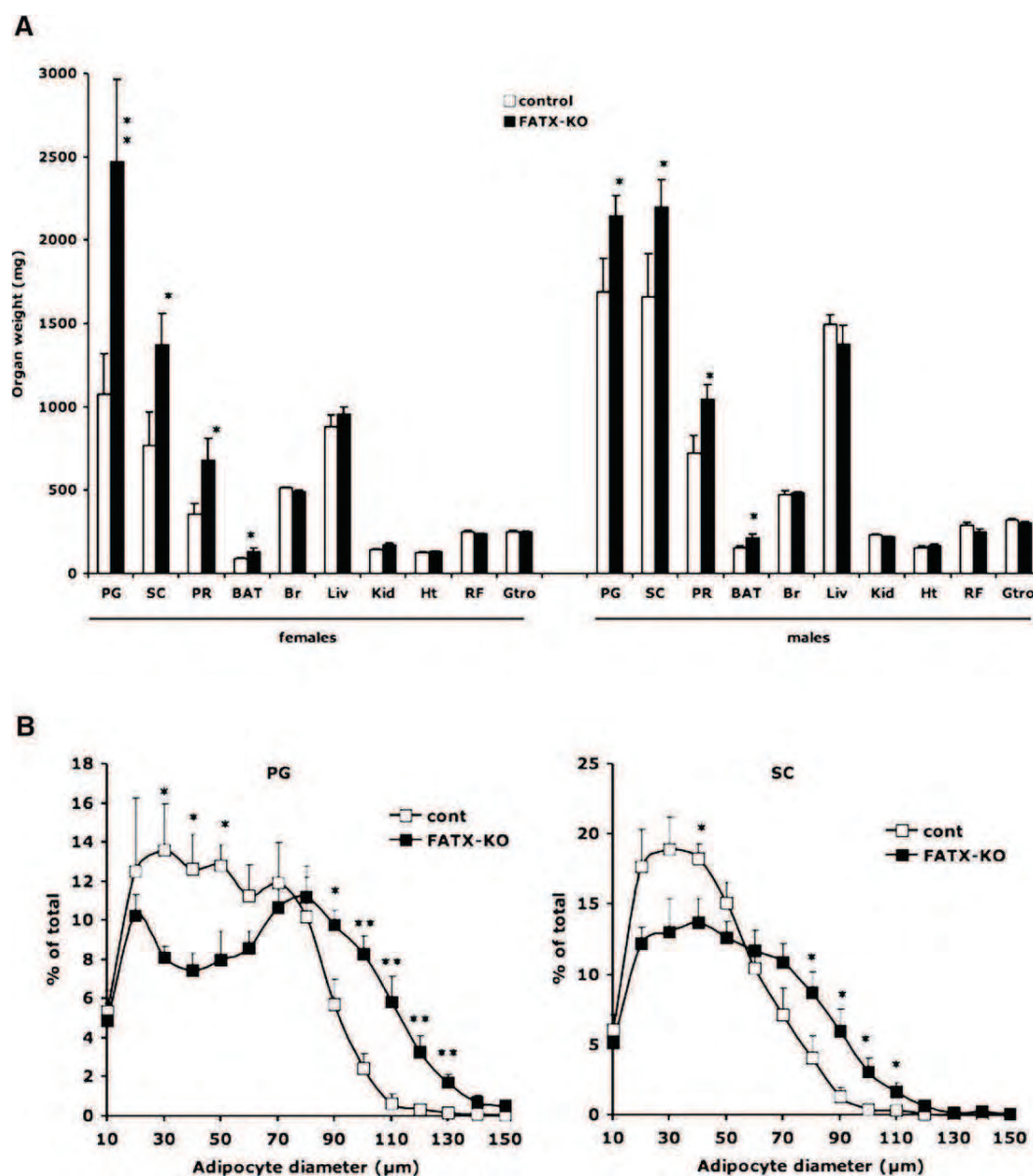


Fig. 3. Adipose-specific disruption of ATX enhances white adipose tissue mass in response to a high-fat diet (HFD). A: Control (white bars; 14 males and 19 females) and FATX-KO (black bars; 15 males and 19 females) mice were fed an HFD and their organs were weighed. PG, perigonadal adipose tissue; SC, subcutaneous adipose tissue; PR, perirenal adipose tissue; BAT, brown adipose tissue; Br, brain; Liv, liver; Kid, kidney; Ht, heart; RF, rectus femoris muscle; Gtro, gastrocnemius muscle. B: Adipocyte size distribution was analyzed in PG and SC from control ($n = 5$) and FATX-KO ($n = 6$) female mice fed an HFD. Values are means \pm SEM. A Student's *t*-test was used for comparison: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

EchoMRI showed that on a HFD, FATX-KO females ($n = 4$) exhibited a significantly higher body fat mass than control females ($n = 4$) (42.1 ± 1.5 vs. $35.7 \pm 2.1\%$, $P < 0.05$) with no significant change in body lean mass (47.0 ± 1.2 vs. $51.8 \pm 2.1\%$). Adipocytes from female FATX-KO mice ($n = 5$) exhibited a higher mean size when compared with control mice ($n = 6$): 66 ± 6 versus 51 ± 4 μm in perigonadal fat ($P = 0.017$); 52 ± 3 versus 41 ± 3 μm in subcutaneous fat ($P = 0.039$). In parallel, no significant difference in adipocyte number (million per fat pad) was noticed between control and FATX-KO mice: 23 ± 5 versus 26 ± 3 for perigonadal adipose tissue; 23 ± 2 versus 24 ± 2 for subcutaneous adipose tissue. Analysis of adipocyte size distribution

showed that FATX-KO mice exhibited a significantly higher proportion of the large adipocytes (higher than 80 and 70 μm in perigonadal and subcutaneous fat pads, respectively) associated with a lower proportion of small adipocytes (lower than 70 and 60 μm in perigonadal and subcutaneous fat pads, respectively) than control mice (Fig. 3B). These results show that adipose-specific disruption of ATX enhances the sensitivity of adipose tissue to expand in response to HFD as the consequence of an hypertrophy rather than an hyperplasia of the adipocytes.

The difference in adipose tissue expansion between control and FATX-KO mice fed an HFD was associated with no significant change in cumulative food intake: $9.5 \pm$

0.4 and 9.9 ± 0.4 g/week/g body weight for control ($n = 8$) and FATX-KO ($n = 10$) female mice, respectively. It thus appears that adipose-specific disruption of ATX has no influence on food intake, suggesting that a possible impact of ATX energy expenditure has to be considered in the future.

FATX-KO mice on an HFD showed no significant difference in fasting blood glucose when compared with control mice (Table 2). Nevertheless, the amplitude of the glycemic response curve obtained after an oral ingestion of glucose was attenuated in FATX-KO female when compared with control mice (Fig. 4). This attenuation was significant as attested by a the significant reduction of the area under the curve: 297 ± 23 versus 411 ± 34 arbitrary unit ($P = 0.012$) in FATX-KO and control mice, respectively. These results indicate the higher sensitivity of FATX-KO mice to expand fat mass, in response to HFD, is associated with a better glucose tolerance.

Adipose-specific disruption of ATX alters gene expression profile in subcutaneous white fat depot

To characterize the influence of ATX disruption on adipose tissue in further detail, we analyzed gene expression in white and brown adipose tissue. Because enhanced sensitivity of FATX-KOs to expand their white adipose tissue in response to an HFD was more pronounced in females than in males, we focused our analysis on females. The expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ 2, aP2, F4/80, adiponectin, leptin and Glut-1 genes was significantly higher in subcutaneous fat from FATX-KO than in control females. This was observed on both ND and HFD conditions (Fig. 5A, B). Immunohistomorphology of subcutaneous fat section revealed no detectable crown-like structure in either control and FATX-KO mice (not shown). In contrast to subcutaneous fat, no significant change in gene expression was observed in perigonadal adipose tissue between FATX-KO and control mice (Fig. 5 A and B). In brown adipose tissue, no significant change in gene expression was observed except for leptin, expression of which was higher in FATX-KO when compared with control mice in agreement with the higher brown adipose tissue mass (Fig. 3A). These results show that adipose tissue-specific disruption of ATX leads to a depot-specific alteration in gene expression profile, particularly in subcutaneous white adipose tissue.

White adipose tissue ATX contributes to plasma LPA

On an ND, FATX-KO mice showed a significant reduction (38%) in plasma LPA when compared with control mice (Fig. 6A). On an HFD, plasma LPA concentration was increased (62%) in control mice when compared with ND. In contrast, in FATX-KO mice, an HFD had no influence on plasma LPA concentration (Fig. 6A). HFD was associated with an increased expression of ATX mRNA in perigonadal and subcutaneous white adipose tissue of control mice, not in FATX-KO mice (Fig. 6B). Interestingly, the induction of ATX expression by an HFD was stronger in subcutaneous (3.5-fold) than in perigonadal (2.4-fold) fat depots. As a result, in control mice on an HFD, subcutaneous fat produced more (1.6-fold) LPA than by perigonadal fat (8.8 ± 1.2 vs. 5.2 ± 0.5 pmoles LPA/50 mg/6 h, $n = 5$; $P < 0.023$, paired t -test). HFD-mediated regulation of ATX was not observed in brown adipose tissue, brain, nor kidney (Fig. 6B). We concluded that white adipose tissue ATX expression significantly influences plasma LPA levels.

DISCUSSION

Our previous studies showed that some forms of obesity in mouse and human are associated with an upregulation of ATX that is mainly restricted to adipose tissue (9, 12). Therefore, the main objective of the present study was to determine the specific contribution of adipose tissue ATX in the development of obesity. To address this, we generated transgenic mice bearing an adipose-specific invalidation of ATX (FATX-KO mice) by using a tissue-specific Cre-lox approach, and we compared their ability to develop nutritional obesity with control littermates. The chosen Cre-lox strategy was based on the predominant cre-recombinase activity in adipose tissue driven by the aP2-promoter (16). Our strategy was successful because a potent disruption of ATX was obtained in white and brown adipose tissue but not in other ATX-expressing organs. In addition, we observed that, in white adipose tissue from FATX-KO mice, the disruption of ATX was restricted to adipocytes and was not observed in the stroma-vascular fraction that also expresses ATX. This is in agreement with the predominant driving activity of the aP2-promoter in

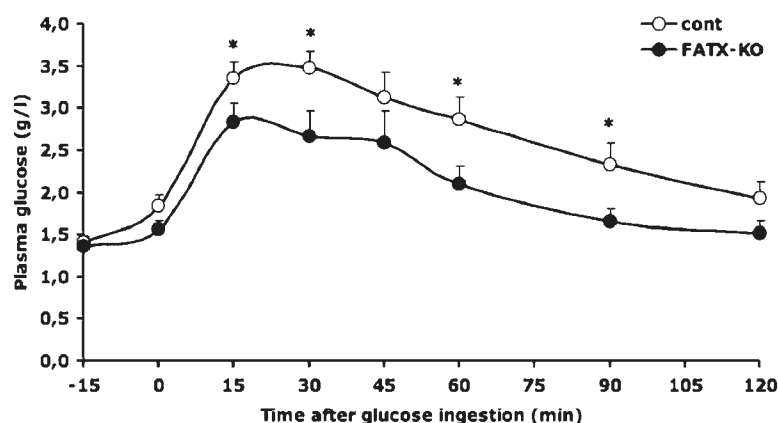


Fig. 4. Adipose-specific disruption of ATX improves glucose tolerance. Control ($n = 8$) and FATX-KO ($n = 7$) female mice were fed an HFD. Plasma glucose concentration was determined before and at different time points after an oral ingestion of a single dose of glucose. Areas under the curve were 411 ± 34 versus 297 ± 23 arbitrary unit ($P = 0.012$) in control and FATX-KO mice, respectively. A Student's t -test was used for comparison: * $P < 0.05$.

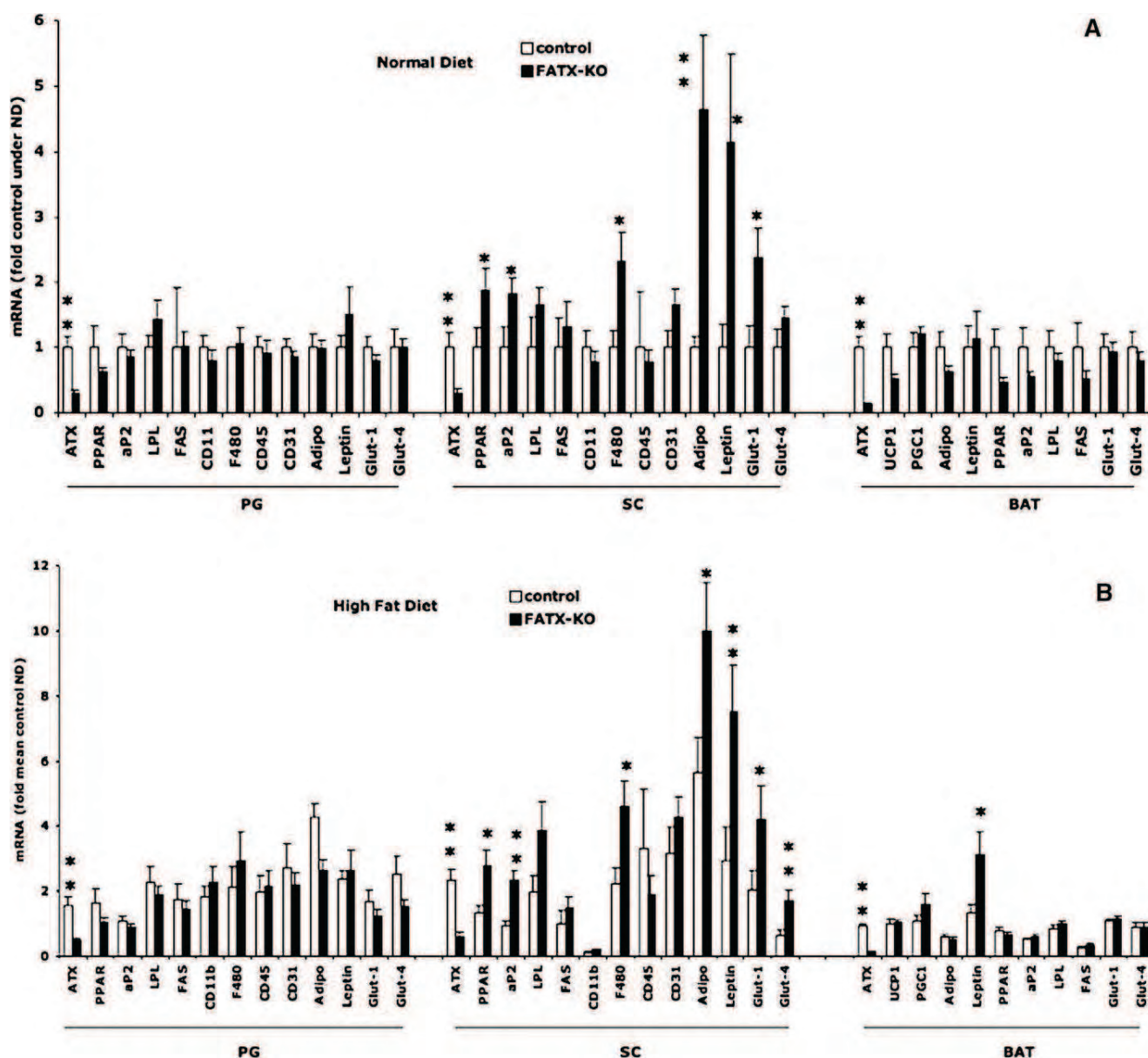


Fig. 5. Adipose-specific disruption of ATX alters gene expression in subcutaneous adipose tissue. Control and FATX-KO mice were fed either a normal diet (ND) (A) or a high-fat diet (HFD) (B) and gene expression was analyzed by real time PCR in perigonadal (PG), subcutaneous (SC), and brown adipose tissue (BAT). Values are means \pm SEM from *n* mice (4 ND and 8 HFD for control; 14 ND and 15 HFD for FATX-KO). A Student's *t*-test was used for comparison: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. ATX, autotaxin; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; FABP, fatty acid binding protein; CD, cluster of differentiation molecule; F4/80, EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1; Glut, glucose transporter; LPL, lipoprotein lipase; FAS, fatty acid synthase; UCP, uncoupling protein; PGC, peroxisome proliferator-activated receptor γ , coactivator.

adipocytes (17), and shows that FATX-KO mice bear an adipocyte-specific disruption of ATX.

Our main finding was that, when fed an HFD, FATX-KO mice exhibited a significantly higher fat mass than control mice. This shows that adipose-specific disruption of ATX increases the sensitivity of adipose tissue to expand when exposed to an HFD, strongly suggesting that adipose tissue-ATX participates in a negative feedback regulation of nutritional obesity. Interestingly, this negative feedback of ATX was not evidenced in mice fed an ND. One can hypothesize that a threshold of ATX ex-

pression needs to be reached to get a negative regulation of fat mass. Thus, ATX expression in control mice is likely too low to exert its inhibitory action so that its disruption in FATX-KO mice has no significant impact on fat mass. In contrast, on an HFD, the expression of ATX is increased above the critical threshold, leading to a significant inhibitory effect on fat mass which, when suppressed in FATX-KO mice, leads to a higher fat mass than in control mice.

The expansion of fat mass in response to HFD is known to result from an increased storage capacity of adipocytes

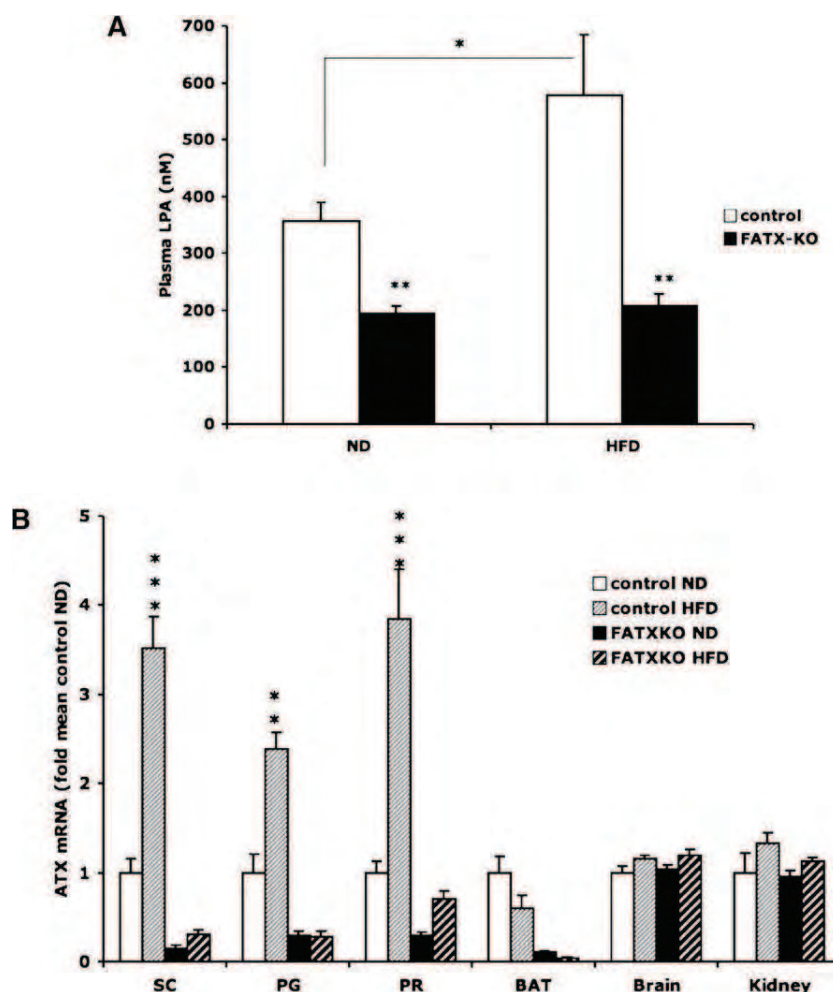



Fig. 6. Adipose-ATX contributes to plasma LPA. Plasma LPA concentration (A) and the expression of ATX gene in perigonadal (PG), subcutaneous (SC), perirenal (PR), brown adipose tissue (BAT), brain, and kidney (B) were quantified in control and FATX-KO male mice fed either a normal diet (ND) or a high-fat diet (HFD). Values are means \pm SEM from 4 control ND, 6 control HFD, 14 FATX-KO ND, and 15 FATX-KO HFD mice. A Student's *t*-test was used for comparison: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

combined with the recruitment of new adipocytes by differentiation of dormant preadipocytes, a process termed adipogenesis. We previously demonstrated that LPA, the product of ATX activity, has an anti-adipogenic activity that was associated with downregulation of PPAR γ 2, a master transcription factor involved in adipocyte differentiation (18). We propose that the hypersensitivity of FATX-KO mice to expand fat mass in response to an HFD might result, at least in part, from the alleviation of the anti-adipogenic effect of LPA produced by adipose tissue. This hypothesis is supported by our findings that subcutaneous adipose tissue from FATX-KO mice exhibits an increased expression of PPAR γ 2 and several PPAR γ 2-regulated genes such as aP2, adiponectin, leptin, glut-1, and glut-4 (19, 20). It is unclear why this increase was observed in subcutaneous adipose tissue but not in other fat depots. One possible explanation is that in control mice, the induction by an HFD of ATX expression and LPA production are more pronounced in subcutaneous than in perigonadal. Therefore, the inhibitory action of ATX on

gene expression is expected to be more pronounced in subcutaneous than in perigonadal fat. Consequently, gene upregulation associated with ATX disruption is expected to be more pronounced in subcutaneous than in perigonadal fat. Another possibility is that, in other depots, ATX acts via a different mechanism. Indeed, it was shown that in contrast to subcutaneous fat, visceral fat expansion in response to an HFD does not involve adipogenesis but rather involves an increased storage capacity of existing adipocytes (21). Besides its involvement in adipogenesis, PPAR γ 2 is also known to increase the storage capacity of adipocytes by improving glucose uptake (22). Consequently, in parallel with its anti-adipogenic impact, ATX could also negatively regulate the storage capacity of adipocytes, for example, by inhibiting glucose homeostasis. This hypothesis is supported by our data showing that FATX-KO mice have larger adipocytes and a better glucose tolerance than control mice.

Finally, the present study also provides insight into the contribution of adipose-ATX to plasma LPA levels. ATX is

the main source of plasma LPA (4). Various organs express ATX, including adipose tissue, but their respective contribution to plasma LPA has been elusive. We observed that plasma LPA is significantly reduced in FATX-KO mice when compared with control mice. Conversely, plasma LPA increases when control mice are fed an HFD and this is accompanied by an upregulation of ATX, specifically in white adipose tissue. These observations clearly indicate that up- or down-regulating ATX in white adipose tissue correlates with plasma LPA concentration. Therefore, we conclude that adipose tissue significantly contributes to plasma LPA. In addition, these results show that the mechanisms by which adipose-ATX regulate fat expansion in response to an HFD could result from a combination of a local and endocrine production of LPA by the adipose tissue.

In conclusion, the present study demonstrates that adipose-ATX negatively regulates fat mass expansion in response to an HFD and contributes to plasma LPA levels. Although the mechanism by which it affects the physiology of adipose tissue in mice remains to be clarified, the present work strongly demonstrates the involvement of adipose-ATX in the development of nutritional obesity. 

The authors thank Yara Barreira and Myriam Ben-Neji (IFR150, Animal Facility) and Sophie Legonidecq and Aurore Desquesnes (IFR150, Functional Exploration Service) for their technological assistance.

REFERENCES

- van Meeteren, L. A., and W. H. Moolenaar. 2007. Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis. *Prog. Lipid Res.* **46**: 145–160.
- Yuelling, L. M., and B. Fuss. 2008. Autotaxin (ATX): a multi-functional and multi-modular protein possessing enzymatic lysoPLD activity and matricellular properties. *Biochim. Biophys. Acta.* **1781**: 525–530.
- Boutin, J. A., and G. Ferry. 2009. Autotaxin. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**: 3009–3021.
- van Meeteren, L. A., P. Ruurs, C. Stortelers, P. Bouwman, M. A. van Rooijen, J. P. Pradere, T. R. Pettit, M. J. Wakelam, J. S. Saulnier-Blache, C. L. Mummery, et al. 2006. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 5015–5022.
- Tanaka, M., S. Okudaira, Y. Kishi, R. Ohkawa, S. Iseki, M. Ota, S. Noji, Y. Yatomi, J. Aoki, and H. Arai. 2006. Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **281**: 25822–25830.
- Fotopoulou, S., N. Oikonomou, E. Grigorieva, I. Nikitopoulou, T. Paparountas, A. Thanassopoulou, Z. Zhao, Y. Xu, D. L. Kontoyiannis, E. Remboutsika, et al. 2010. ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system. *Dev. Biol.* **339**: 451–464.
- Liu, S., M. Murph, N. Panupinthu, and G. B. Mills. 2009. ATX-LPA receptor axis in inflammation and cancer. *Cell Cycle.* **8**: 3695–3701.
- Gesta, S., M. F. Simon, A. Rey, D. Sibrac, A. Girard, M. Lafontan, P. Valet, and J. S. Saulnier-Blache. 2002. Secretion of a lysophospholipase D activity by adipocytes: involvement in lysophosphatidic acid synthesis. *J. Lipid Res.* **43**: 904–910.
- Ferry, G., E. Tellier, A. Try, S. Gres, I. Naime, M. F. Simon, M. Rodriguez, J. Boucher, I. Tack, S. Gesta, et al. 2003. Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J. Biol. Chem.* **278**: 18162–18169.
- Pradere, J. P., E. Tarnus, S. Gres, P. Valet, and J. S. Saulnier-Blache. 2007. Secretion and lysophospholipase D activity of autotaxin by adipocytes are controlled by N-glycosylation and signal peptidase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1771**: 93–102.
- Ferry, G., N. Moulharat, J. P. Pradere, P. Desos, A. Try, A. Genton, A. Giganti, M. Beucher-Gaudin, M. Lonchamp, M. Bertrand, et al. 2008. S32826, a nanomolar inhibitor of autotaxin: discovery, synthesis and applications as a pharmacological tool. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **327**: 809–819.
- Boucher, J., D. Quilliot, J. P. Praderes, M. F. Simon, S. Gres, C. Guigne, D. Prevot, G. Ferry, J. A. Boutin, C. Carpenne, et al. 2005. Potential involvement of adipocyte insulin resistance in obesity-associated up-regulation of adipocyte lysophospholipase D/autotaxin expression. *Diabetologia.* **48**: 569–577.
- He, W., Y. Barak, A. Hevener, P. Olson, D. Liao, J. Le, M. Nelson, E. Ong, J. M. Olefsky, and R. M. Evans. 2003. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**: 15712–15717.
- Morin, C. L., E. C. Gayles, D. A. Podolin, Y. Wei, M. Xu, and M. J. Pagliassotti. 1998. Adipose tissue-derived tumor necrosis factor activity correlates with fat cell size but not insulin action in aging rats. *Endocrinology.* **139**: 4998–5005.
- Saulnier-Blache, J. S., A. Girard, M. F. Simon, M. Lafontan, and P. Valet. 2000. A simple and highly sensitive radioenzymatic assay for lysophosphatidic acid quantification. *J. Lipid Res.* **41**: 1947–1951.
- Barlow, C., M. Schroeder, J. Lektrom-Himes, H. Kylefjord, C. X. Deng, A. Wynshaw-Boris, B. M. Spiegelman, and K. G. Xanthopoulos. 1997. Targeted expression of Cre recombinase to adipose tissue of transgenic mice directs adipose-specific excision of loxP-flanked gene segments. *Nucleic Acids Res.* **25**: 2543–2545.
- Graves, R. A., P. Tontonoz, S. R. Ross, and B. M. Spiegelman. 1991. Identification of a potent adipocyte-specific enhancer: involvement of an NF-1-like factor. *Genes Dev.* **5**: 428–437.
- Simon, M. F., D. Daviaud, J. P. Pradere, S. Gres, C. Guigne, M. Wabitsch, J. Chun, P. Valet, and J. S. Saulnier-Blache. 2005. Lysophosphatidic acid inhibits adipocyte differentiation via lysophosphatidic acid 1 receptor-dependent down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. *J. Biol. Chem.* **280**: 14656–14662.
- Iwaki, M., M. Matsuda, N. Maeda, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, M. Makishima, and I. Shimomura. 2003. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes.* **52**: 1655–1663.
- Nugent, C., J. B. Prins, J. P. Whitehead, D. Savage, J. M. Wentworth, V. K. Chatterjee, and S. O'Rahilly. 2001. Potentiation of glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by PPAR gamma agonists is maintained in cells expressing a PPAR gamma dominant-negative mutant: evidence for selectivity in the downstream responses to PPAR gamma activation. *Mol. Endocrinol.* **15**: 1729–1738.
- Joe, A. W., L. Yi, Y. Even, A. W. Vogl, and F. M. Rossi. 2009. Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet. *Stem Cells.* **27**: 2563–2570.
- Takano, H., and I. Komuro. 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cardiovascular diseases. *Circ. J.* **73**: 214–220.

- ***Principales observations et commentaires***

Dans cet article, nous avons créé un modèle de souris invalidé pour l'ATX spécifiquement dans les adipocytes grâce à l'expression de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur aP2: souris F-ATX KO. Ces souris sont plus sensibles à l'obésité induite par un régime riche en gras comparativement aux souris sauvages. Il existerait donc une **boucle de rétrocontrôle** : **en situation d'expansion du tissu, l'expression de l'ATX adipocytaire augmente et le LPA agirait au niveau du tissu adipeux de façon paracrine comme un frein à son expansion.**

Mais le LPA produit par le tissu adipeux pourrait également avoir un effet à distance, et agir comme d'autres lipokines via une action systémique. En effet, dans cet article nous avons montré qu'en situation «normo-pondérale», **l'ATX adipocytaire participe pour environ 40% aux taux plasmatiques de LPA.** Et en situation d'obésité, nous avons montré que parallèlement à l'augmentation de l'expression de l'ATX, on observait une augmentation des taux plasmatiques de LPA. Grâce à notre modèle d'invalidation adipocyte-spécifique nous avons pu prouver que l'augmentation des taux plasmatiques de LPA en situation d'obésité était majoritairement due à sa production adipocytaire.

Le phénotype d'adiposité trouvé chez nos souris F-ATX KO est de façon surprenante associé à une meilleure tolérance au glucose. La signalisation ATX/LPA apparaît alors comme un axe délétère, qui participe à la mise en place de la gluco-intolérance associée à l'obésité. Il avait été montré dans l'équipe que l'expression de l'ATX était en lien étroit avec le statut de gluco-intolérance [37]. Ici l'invalidation de l'ATX améliore cette gluco-tolérance, suggérant que **l'augmentation de l'ATX dans le tissu adipeux participerait à la mise en place de l'intolérance au glucose associée à l'obésité.**

Nous nous sommes ensuite demandés si cet effet passait par les récepteurs aux LPA. Pour répondre à cette question, nous avons mis en place un traitement pharmacologique visant à bloquer les récepteurs LPA1 et 3 (**Protocole complémentaire 1**).

III- Protocole complémentaire 1

Une alternative parallèle a été de bloquer les récepteurs LPA1/3 via l'utilisation d'un antagoniste mixte utilisable *in vivo*, le Ki16425 [126].

Matériel et méthodes :

Les animaux sont nourris avec un régime hyper lipidique (HFD) (20% protéines, 35% glucides et 45% lipides (Research Diet, France)). Le Ki16425 (Cayman Chemicals) est dilué à la concentration de 1mg/ml dans du PBS supplémenté avec 10% de DMSO. Le traitement au Ki16425 commence 9 semaines après le début de la mise en régime gras et consiste en une injection quotidienne de Ki16425 à 5mg/kg. Pour les autres méthodes, se reporter au premier article.

Résultats :

Après 9 semaines d'alimentation HFD, les souris ont été traitées quotidiennement par une injection intra-péritonéale au Ki16425 (5mg/kg). Après 3 semaines, le traitement au Ki16425 n'a aucune influence significative sur la prise de poids (Figure 1A and B) et la composition corporelle (masse grasse et maigre) (Figure 1C). Après 7 semaines, les souris traitées présentent une augmentation significative du poids corporel (Figure 1A and B) due à une augmentation de la masse grasse montrée par echoMRI (sans aucun changement dans la masse maigre) (Figure 1C). Ces changements n'étaient pas associés à une altération de la consommation alimentaire (Figure 1E). Les souris traitées au Ki16425 ont montré une augmentation du poids de plusieurs dépôts adipeux (sous-cutanée, peri-gonadique, mésentérique et brun), tandis que les autres organes ne sont pas affectés (Figure 1D). Les dépôts sous-cutanés et peri-gonadique des souris traités au Ki16425 présentent des adipocytes plus gros (alors que leur nombre est resté inchangé) (Figure 1 F et G), comparativement au groupe de contrôle. Il s'agit d'une caractéristique de l'obésité hypertrophique.

En accord avec les modifications de la masse grasse, l'expression et la concentration plasmatique de deux adipokines, la leptine et l'adiponectine, ont augmenté de façon significative (Figure 2 et 3 A). En parallèle, aucun changement de la concentration plasmatique d'acides gras libres ou des triglycérides n'a été observé après le traitement

(Figure 2B). Ces observations ont montré que, après une période de traitement plus longue, le Ki16425 induit engraissement et hypertrophie adipocytaire, sans aucun signe de dyslipidémie.

L'hypertrophie adipocytaire est associée à une meilleure capacité à stocker les lipides. La FAS (acide gras synthase) est une enzyme déterminante dans la lipogenèse qui joue un rôle chez la souris au niveau du foie et du tissu adipeux, en condition d'excès énergétique pour permettre son stockage. L'expression de la FAS est étroitement dépendante de la sensibilité à l'insuline du foie et du tissu adipeux. Dans nos conditions, le traitement au Ki16425 amplifie significativement l'induction d'expression de la FAS par la réalimentation des souris à jeun dans le tissu adipeux induite (Figure 3A) mais pas dans le foie (Figure 3B). Ces observations suggèrent que le Ki16425 favorise l'activité lipogénique du tissu adipeux en agissant sur sa sensibilité à l'insuline. Cette hypothèse est supportée par les résultats des Figures 4 et 5 montrant que le traitement au Ki16425 améliore la tolérance au glucose et à l'insuline.

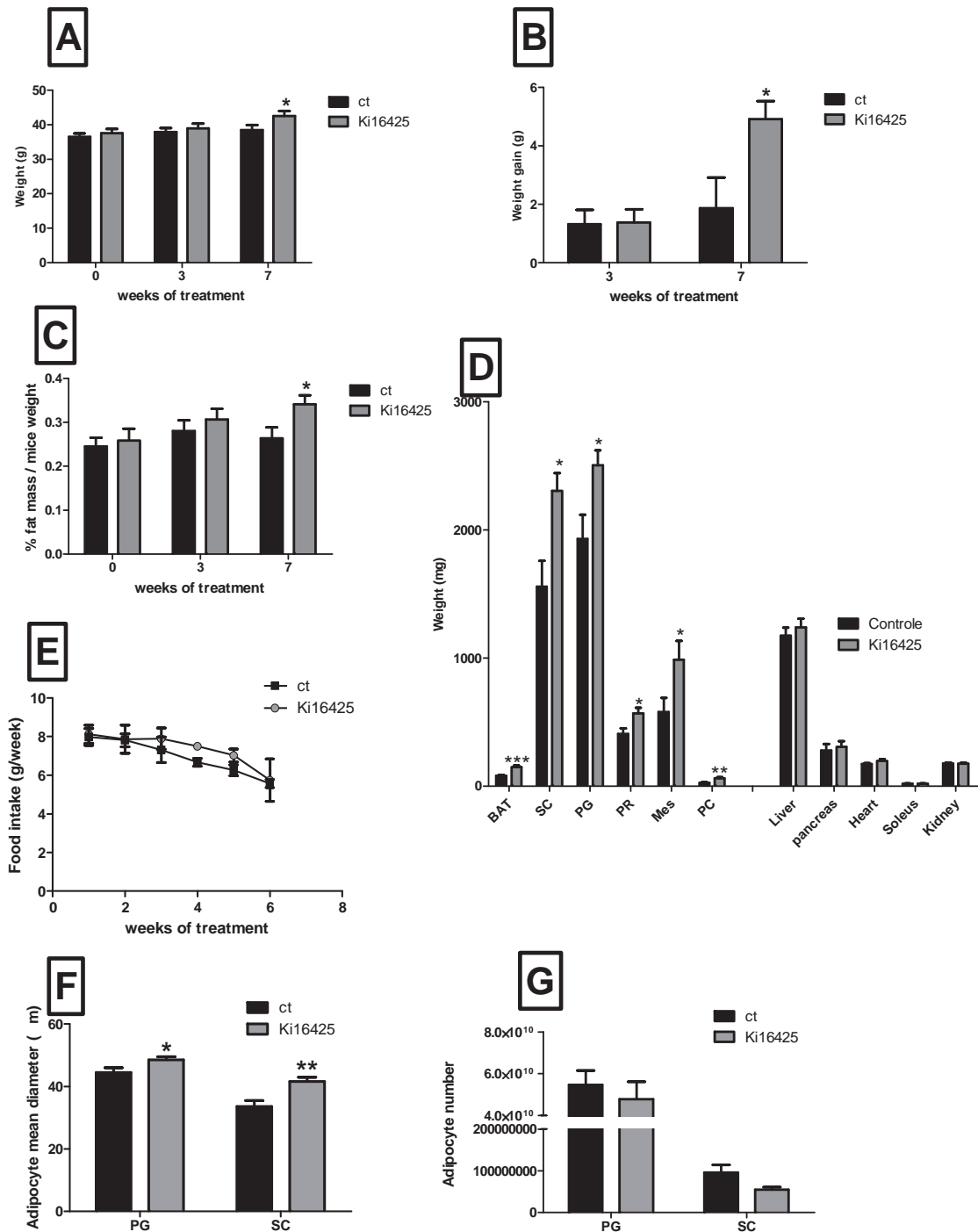


Figure 1: Le traitement au Ki16425 sensibilise à l'obésité nutritionnelle
A and B: Poids et gain de poids au cours du traitement
C: Mesure de l'adiposité par méthode d'EchoMRI
D: Poids de différents tissus après 7 semaines de traitement
E: Suivi de la prise alimentaire mesurée sur une semaine
F and G: Etude de la cellularité des dépôts adipeux sous-cutannés et péri-gonadiques, diamètre moyen adipocytaire (F) et nombre d'adipocytes par dépôt (G)
n=11 par groupe *t test* *:p<0.05 **:p<0.01 ***:p<0.001

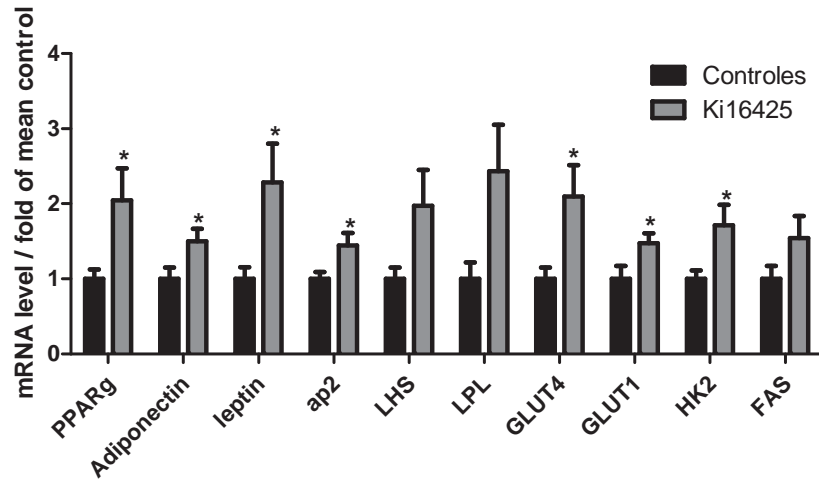


Figure 2: Le traitement au Ki16425 modifie l'expression génique de gènes adipocytaires
 Expression génique (en fois de variation du contrôle) mesuré au niveau du sous cutané de souris contrôles ou traitées au Ki16425 pendant 7 semaines
n=11 par groupe *t test *:p<0.05*

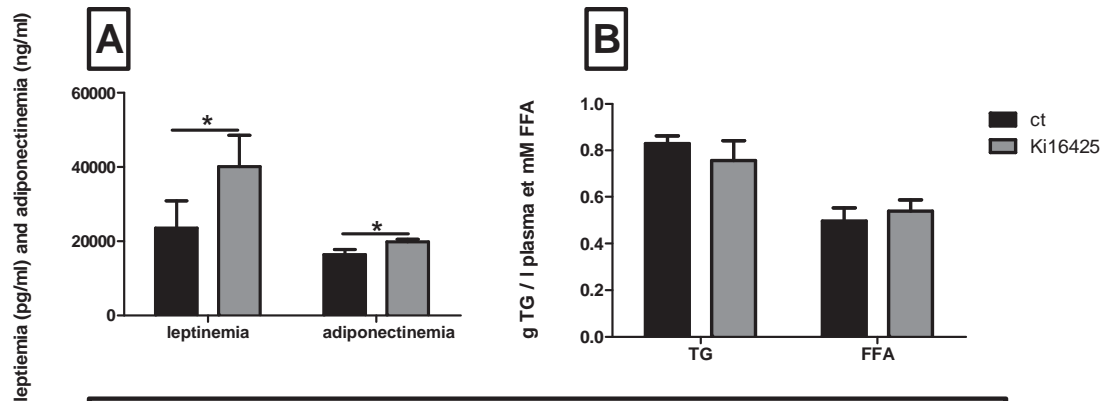


Figure 3: Marqueurs plasmatiques
 Mesure de la leptinémie, de l'adiponectinémie, des tryglycérides et acides gras libres plasmatiques après 7 semaines de traitement
n=11 par groupe *t test *:p<0.05*

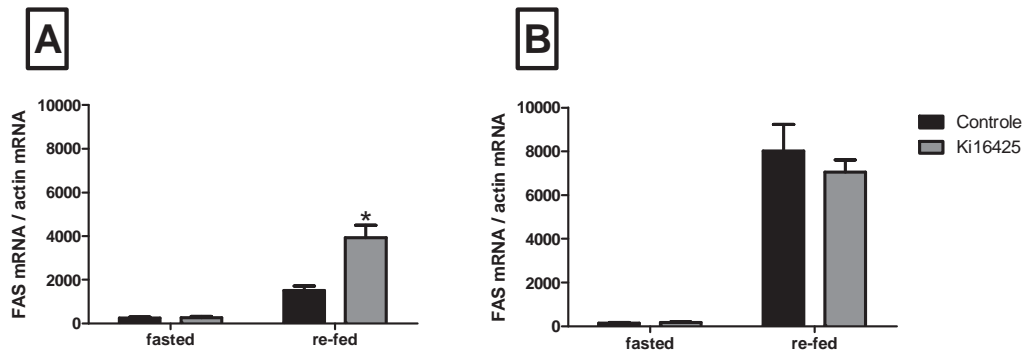


Figure 4: Le traitement au Ki16425 augmente l'expression de la FAS en réponse à la ré-alimentation uniquement dans le tissu adipeux
Variation de l'expression de la FAS dans le tissu adipeux péri-gonadique (A) et le foie (B) de souris controle ou traitées au Ki16425 en fonction du statut nutritionnel (jeune sur le nuit ou 18h après une ré-alimentation)

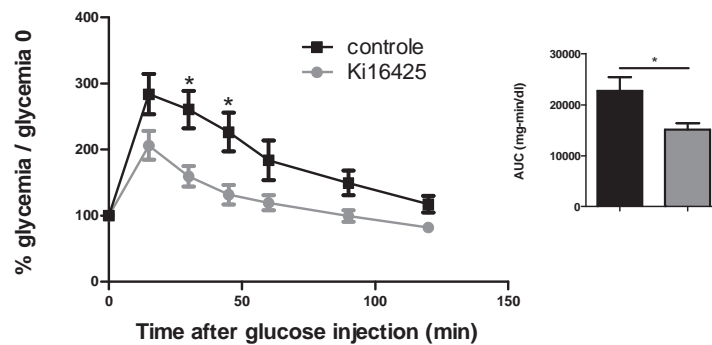


Figure 5: Le traitement Ki16425 améliore la tolérance au glucose
Test de tolérance au glucose réalisé après 6 semaines de traitement au Ki16425
n=11 par groupe
Anova *: $p < 0.05$

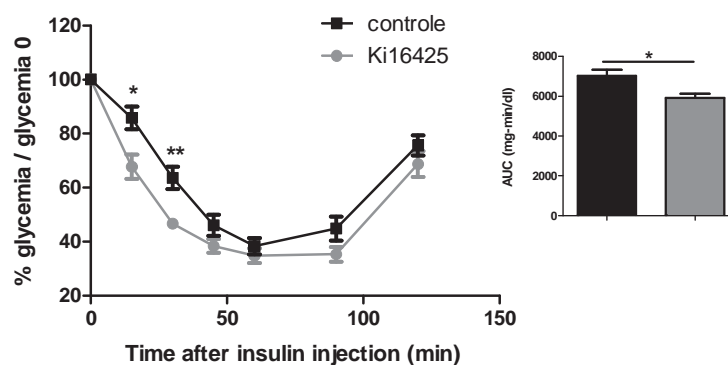


Figure 6: Le traitement au Ki16425 améliore la tolérance à l'insuline
Test de tolérance à l'insuline réalisé après 6 semaines de traitement au Ki16425
n=11 par groupe
Anova *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

• *Principales observations et commentaires*

Ce protocole de traitement pharmacologique a permis d'obtenir des résultats proches de ceux obtenus avec les souris F-ATX KO (**premier article**). Dans les 2 cas, bloquer la signalisation ATX/LPA induit une augmentation de la prise de masse grasse, associée à une hypertrophie adipocytaire et de façon surprenante à une meilleure tolérance au glucose.

Avec le traitement pharmacologique nous avons pu mettre en évidence que les effets anti-obésogènes du LPA étaient dépendants des récepteurs au LPA et plus particulièrement des récepteurs LPA1 et/ou 3. Il serait maintenant intéressant de savoir si cet effet passe bien, comme le suggèrent les données *in vitro*, par le récepteur LPA1. Pour ce faire, on pourrait utiliser un antagoniste sélectif pour ce récepteur comme l'AM966 [354] ou l'AM095 [54, 355]. En effet de plus en plus de molécules qui ciblent les récepteurs au LPA sont en cours d'élaboration et d'autres composés antagonistes de LPA1 sont en cours d'expérimentation [310].

Les observations faites lors de ma thèse suggèrent que le LPA (via LPA1 et/ou 3) exerce un effet tonique inhibiteur sur l'expansion des dépôts adipeux. Cette conclusion est en accord avec l'activité anti-adipogénique du LPA qui avait précédemment été mise en évidence par l'équipe *in vitro*. Cependant, la régulation de l'adipogenèse *in vivo* conduit généralement à une augmentation du nombre des adipocytes (hyperplasie) [362]. Toutefois, les adipocytes des souris FATX-KO et des souris traitées au Ki16425 ne sont pas hyperplasiques mais hypertrophiques. Ainsi, l'activité anti-adipogénique du LPA n'est probablement pas suffisante pour expliquer l'effet inhibiteur du LPA sur l'expansion du tissu adipeux. L'hypertrophie adipocytaire reflète une meilleure capacité d'adipocytes pour stocker les triglycérides (lipogenèse), un événement métabolique qui dépend étroitement de la sensibilité à l'insuline. Fait intéressant, le tissu adipeux de souris FATX-KO présente une expression plus élevée du facteur de transcription PPAR 2 ainsi que de plusieurs de ses gènes cibles (adiponectine, leptine, GLUT-1) par rapport au type sauvage. Ceci est également observé après le traitement chronique au Ki16425 (Figure 2). Par conséquent, le tissu adipeux de souris FATX-KO et des souris traitées au Ki16425 montrent une amélioration apparente de la sensibilité à l'insuline. Ainsi, l'effet inhibiteur tonique du LPA sur l'expansion du tissu adipeux pourrait, au moins en partie, être médié par l'inhibition de sensibilité à l'insuline des adipocytes. Une telle hypothèse est étayée par les résultats obtenus lors du protocole complémentaire (Ki16425), montrant que l'induction, lors de la réalimentation, de

l'expression de la FAS (acide gras synthase sensible à l'insuline), est plus forte dans le tissu adipeux de souris traitées au Ki16425, par rapport à des souris témoins. Il serait intéressant de valider *in vivo* et *in vitro* cette lipogenèse en suivant cette voie métabolique et non pas seulement l'expression génique d'une des enzymes clés de cette voie. Cette méthode se basant sur l'utilisation de glucose radio-marqué suivi d'un dosage des lipides radioactifs formés est réalisée en routine au laboratoire et pourrait être étudiée dans nos conditions.

De façon surprenante, chez les souris FATX-KO et les souris traitées au Ki16425, l'augmentation de la prise de poids est associée à une meilleure tolérance au glucose. Ceci est surprenant car il est souvent admis que la tolérance au glucose est altérée en situation d'obésité. Le traitement Ki16425, a entraîné une adipogenèse, associée à une augmentation des gènes adipocytaires (PPAR γ 2, ap2, adiponectine, leptine, GLUT-1 et4, etc) (Figure 2). Cet effet participe à une amélioration du métabolisme glucidique global de l'animal, comme peuvent le faire des molécules antagoniste des PPAR tels que les thiazolidinediones. Il serait intéressant de voir si cet effet peut perdurer. Pour cela nous pourrions réaliser le même protocole de 7 semaines, puis regarder s'il a un impact quelques semaines après la fin du traitement.

Les 2 protocoles induisent une amélioration du métabolisme glucidique systémique, mais le LPA pourrait avoir un effet sur la sensibilité à l'insuline du tissu adipeux, comme suggéré ci-dessus, mais aussi au niveau des tissus cibles de l'insuline et plus particulièrement des muscles, foie (puisque le LPA peut agir via une voie systémique) ou du pancréas. Le foie, par contre, ne semble pas être touché puisque l'induction de la FAS lors du protocole de réalimentation (Figure 3) n'est pas impactée par le traitement. Le LPA apparaît alors comme une sécrétion du tissu adipeux augmentée en situation d'obésité et agissant de façon délétère sur le métabolisme glucidique comme le font d'autres adipokines. Cet effet du LPA pourrait aussi être un effet indirect. En effet, en limitant le stockage de l'excédent énergétique dans le tissu adipeux, par son effet anti-adipogénique, le LPA pourrait entraîner une accumulation ectopique des lipides dans des tissus qui n'ont pas cette fonction. Cela entraînerait une forte lipotoxicité connue pour altérer la sécrétion d'insuline au niveau pancréatique ou la sensibilité à l'insuline au niveau des muscles ou du foie. Il serait alors intéressant dans ce protocole de doser les triglycérides au niveau de ces tissus.

Aux vues de l'ensemble de ces données, lors de la seconde partie de ma thèse, j'ai voulu savoir si le LPA pouvait avoir un effet direct sur la tolérance au glucose. Ces données sont exposées dans la partie **Résultats 2: ATX/LPA et gluco-intolérance.**

Résultats 2 : ATX/LPA et Gluco- intolérance

I- Contexte bibliographique et projet

L'axe ATX/LPA semble jouer un rôle dans le métabolisme glucidique. En effet, des données de l'équipe ont mis en évidence que l'augmentation de l'expression de l'ATX au sein du tissu adipeux était en lien étroit avec le statut d'insulino-résistance chez l'homme et chez la souris. Les données récentes obtenues lors de ma thèse ont mis en évidence que la signalisation ATX/LPA était impliquée dans la mise en place de la gluco-intolérance associée à l'obésité, par des études de blocage transgénique (souris F-ATX KO - **article 1**) et pharmacologique (traitement Ki16425 de 7 semaines – **protocole complémentaire 1**).

L'enjeu, dans cette partie, est de mieux décrire l'impact de la signalisation ATX/LPA sur la gluco-intolérance.

Dans l'étude présentée dans **l'article 2**, nous avons cherché à regarder si la signalisation ATX/LPA pouvait avoir un rôle direct sur le métabolisme glucidique. Premièrement en aigu, lors de tests systémiques de tolérance au glucose puis plus précisément au niveau pancréatique. Ces résultats nous ont ensuite mené à poursuivre cette étude par un protocole chronique de blocage de la signalisation ATX/LPA, de même type que le protocole complémentaire 1 avec un traitement au Ki16425. Nous avons par contre choisi un traitement plus court, qui n'a pas d'impact sur l'adiposité, de manière à pouvoir dissocier les possibles effets directs du LPA sur la gluco-tolérance et ceux indirects qui passeraient par un plus fort stockage énergétique au niveau du tissu adipeux qui s'hypertrophie.

II- Article 2

Lysophosphatidic acid impairs glucose homeostasis and inhibits insulin secretion in high-fat diet obese mice.

Rancoule C, Attané C, Grès S, Fournel A, Dusaulcy R, Bertrand C, Vinel C, Tréguer K, Prentki M, Valet P, Saulnier-Blache JS.

Diabetologia. 2013 Jun;56(6):1394-402

Lysophosphatidic acid impairs glucose homeostasis and inhibits insulin secretion in high-fat diet obese mice

C. Rancoule · C. Attané · S. Grès · A. Fournel ·
R. Dusauley · C. Bertrand · C. Vinel · K. Tréguer ·
M. Prentki · P. Valet · J. S. Saulnier-Blache

Received: 3 October 2012 / Accepted: 4 March 2013 / Published online: 19 March 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract

Aims/hypothesis Lysophosphatidic acid (LPA) is a lipid mediator produced by adipocytes that acts via specific G-protein-coupled receptors; its synthesis is modulated in obesity. We previously reported that reducing adipocyte LPA production in high-fat diet (HFD)-fed obese mice is associated with improved glucose tolerance, suggesting a negative impact of LPA on glucose homeostasis. Here, our aim was to test this hypothesis.

Methods First, glucose tolerance and plasma insulin were assessed after acute (30 min) injection of LPA (50 mg/kg) or of the LPA1/LPA3 receptor antagonist Ki16425 (5 mg kg⁻¹ day⁻¹, i.p.) in non-obese mice fed a normal diet (ND) and in obese/prediabetic (defined as glucose-intolerant) HFD mice. Glucose and insulin tolerance, pancreas morphology,

glycogen storage, glucose oxidation and glucose transport were then studied after chronic treatment (3 weeks) of HFD mice with Ki16425.

Results In ND and HFD mice, LPA acutely impaired glucose tolerance by inhibiting glucose-induced insulin secretion. These effects were blocked by pre-injection of Ki16425 (5 mg/kg, i.p.). Inhibition of glucose-induced insulin secretion by LPA also occurred in isolated mouse islets. Plasma LPA was higher in HFD mice than in ND mice and Ki16425 transiently improved glucose tolerance. The beneficial effect of Ki16425 became permanent after chronic treatment and was associated with increased pancreatic islet mass and higher fasting insulinaemia. Chronic treatment with Ki16425 also improved insulin tolerance and increased liver glycogen storage and basal glucose use in skeletal muscle.

Conclusions/interpretation Exogenous and endogenous LPA exerts a deleterious effect on glucose disposal through a reduction of plasma insulin; pharmacological blockade of LPA receptors improves glucose homeostasis in obese/prediabetic mice.

Keywords Antagonist · Glucose homeostasis · Insulin · Lysophosphatidic acid · Obesity · Receptors

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00125-013-2891-3) contains peer-reviewed but unedited supplementary material, which is available to authorised users.

C. Rancoule · S. Grès · A. Fournel · R. Dusauley · C. Bertrand ·
C. Vinel · K. Tréguer · P. Valet · J. S. Saulnier-Blache (✉)
Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC),
Université Paul Sabatier, Inserm U1048, 1 avenue Jean Poulhès,
BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France
e-mail: Jean-Sebastien.Saulnier-Blache@inserm.fr

C. Attané · M. Prentki
Molecular Nutrition Unit and Montreal Diabetes Research Center
at the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université
de Montréal (CHUM), Montréal, QC, Canada

M. Prentki
Department of Nutrition, Université de Montréal,
Montréal, QC, Canada

M. Prentki
Department of Biochemistry, Université de Montréal,
Montréal, QC, Canada

Abbreviations

ATX	Autotaxin
FATX-KO	Adipocyte-specific ATX knockout
HFD	High-fat diet
KH	Krebs–Henseleit
KRBH	Krebs Ringer Bicarbonate HEPES buffer
LPA	Lysophosphatidic acid
MCP	Monocyte chemotactic protein
ND	Normal diet

Introduction

Excessive accumulation of adipose tissue in obesity is frequently associated with metabolic defects (postprandial hyperglycaemia, dyslipidaemia, insulin resistance) that may lead to type 2 diabetes and cardiovascular diseases (hypertension, atherosclerosis, nephropathies) [1, 2]. In parallel with its lipid storage capacity, the adipose tissue produces various bioactive molecules (adipokines, reactive phospholipids, glycerol, NEFA). The export of these molecules from adipose tissue is often altered in obese individuals and some of them (TNF- α , resistin, monocyte chemoattractant protein-1 [MCP-1]) exert deleterious effects on glucose metabolism and insulin sensitivity [3].

Lysophosphatidic acid (LPA) is a phospholipid mediator that regulates several cellular responses (proliferation, migration, differentiation) via specific G-protein-coupled receptors (LPA1R to LPA6R) [4]. LPA is synthesised via the hydrolysis of lysophosphatidylcholine by a secreted lysophospholipase D (autotaxin [ATX]) [5, 6]. The available pharmacological tools targeting ATX/LPA signalling are still scarce [7–9]. Ki16425 [10] is a mixed LPA receptor antagonist that exhibits close and preferential affinity for the LPA1R and LPA3R subtypes (250 and 360 nmol/l, respectively) [8, 10] and its *in vivo* antagonist efficiency has been documented [11–13].

White adipose tissue secretes ATX and LPA in the extracellular milieu [12, 14–16]. The expression of ATX is increased in the adipose tissue of obese insulin-resistant individuals and mice [16–18]. Plasma levels of LPA are increased in high-fat diet (HFD) obese mice as the result of an increased expression of ATX in adipocytes [19]. Invalidation of ATX in adipocytes (FATX-KO mice) reduces plasma LPA and enhances fat mass in HFD-fed mice [19], in agreement with the anti-adipogenic effect of LPA [20].

Whereas the growth factor-like properties of LPA have been studied extensively, a few and primarily *in vitro* studies have reported that LPA also regulates glucose metabolism [21–23]. Interestingly, *in vivo* deletion of ATX in adipocytes (FATX-KO mice) is associated with a better glucose tolerance [19], suggesting a negative effect of LPA on glucose homeostasis. If this hypothesis is correct, LPA receptors could represent valuable pharmacological targets for the treatment of impaired glucose homeostasis associated with obesity.

Our objective was to study the influence of LPA on glucose and insulin homeostasis. We found that administration of LPA to mice impairs glucose disposal via a reduction of plasma insulin levels, and that chronic pharmacological blockade of the LPA receptors restores normal glucose homeostasis in HFD obese/prediabetic (defined as glucose intolerant) mice.

Methods

Mice C57Bl6/J male mice were housed conventionally under a constant temperature (20–22°C) and humidity (50–60%) with a 12/12 h light/dark cycle (lights on at 07:00 hours) and free access to food and water. Mice were handled in accordance with the principles and guidelines established by the National Institute of Medical Research (Inserm) and in conformity with the ‘Principles of laboratory animal care’ (NIH publication no. 85–23, revised 1985 <http://grants1.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.htm>). The local animal facility committee at Inserm approved our protocols.

Diet The mice were first fed a normal diet (ND; energy content 16% protein, 81% carbohydrate and 3% fat [SAFE, Augy, France]) until the age of 10 weeks. Mice were then fed either an ND or an HFD (energy content 20% protein, 35% carbohydrate and 45% fat [Research Diets-Brogaarden (Lyngby, Denmark)]) for 9 weeks. At that step, HFD mice were considered obese and prediabetic. They had a higher body weight (35.6 ± 1.0 vs 29.9 ± 0.6 g; $p < 0.01$) and a higher body-fat mass (24.6 ± 2.0 vs 5.6 ± 1.1 % of total body weight; $p < 0.001$) when compared with ND mice. Moreover, HFD mice displayed a deterioration in glucose tolerance (35% increase in AUC when compared with ND mice) (Control, Fig. 1d, e vs i, j) associated with a slight increase in fasting glycaemia (Control, Fig. 1b vs g) but no change in fasting insulinaemia (Control, Fig. 1c vs h).

Treatment Ki16425 Cayman Chemicals-Interchim (Montluçon, France) was diluted at a concentration of 1 mg/ml in PBS supplemented with 10% DMSO. LPA (oleoyl lysophosphatidic acid; Avanti Polar, Alabaster, AL, USA) was diluted at 15 mg/ml in PBS supplemented with 1% fatty-acid-free BSA. Ki16425 (5 mg/kg), LPA (50 mg/kg) and vehicle (control) were administered by *i.p.* injection. Treatments with Ki16425 and LPA started 9 weeks after beginning the feeding protocol. The dose of LPA injected was adapted from previous reports [24, 25]. The concentration of Ki16425 used had previously been demonstrated to block LPA receptors *in vivo* [26]. Acute treatments consisted of injecting a single dose of LPA or Ki16425 30 min before conducting glucose or insulin tolerance tests. Acute treatments were performed on ND and HFD mice after 9 weeks of diet. Chronic treatment consisted of a daily injection of Ki16425 for 3 weeks. HFD was maintained during chronic treatment. Chronic treatment was followed by glucose or insulin tolerance tests, which were conducted 24 h after the last injection of Ki16425. After glucose or insulin tolerance tests, treatment with Ki16425 was continued for few days before the mice were killed after an overnight fasting. Plasma and organs were collected for further analysis.

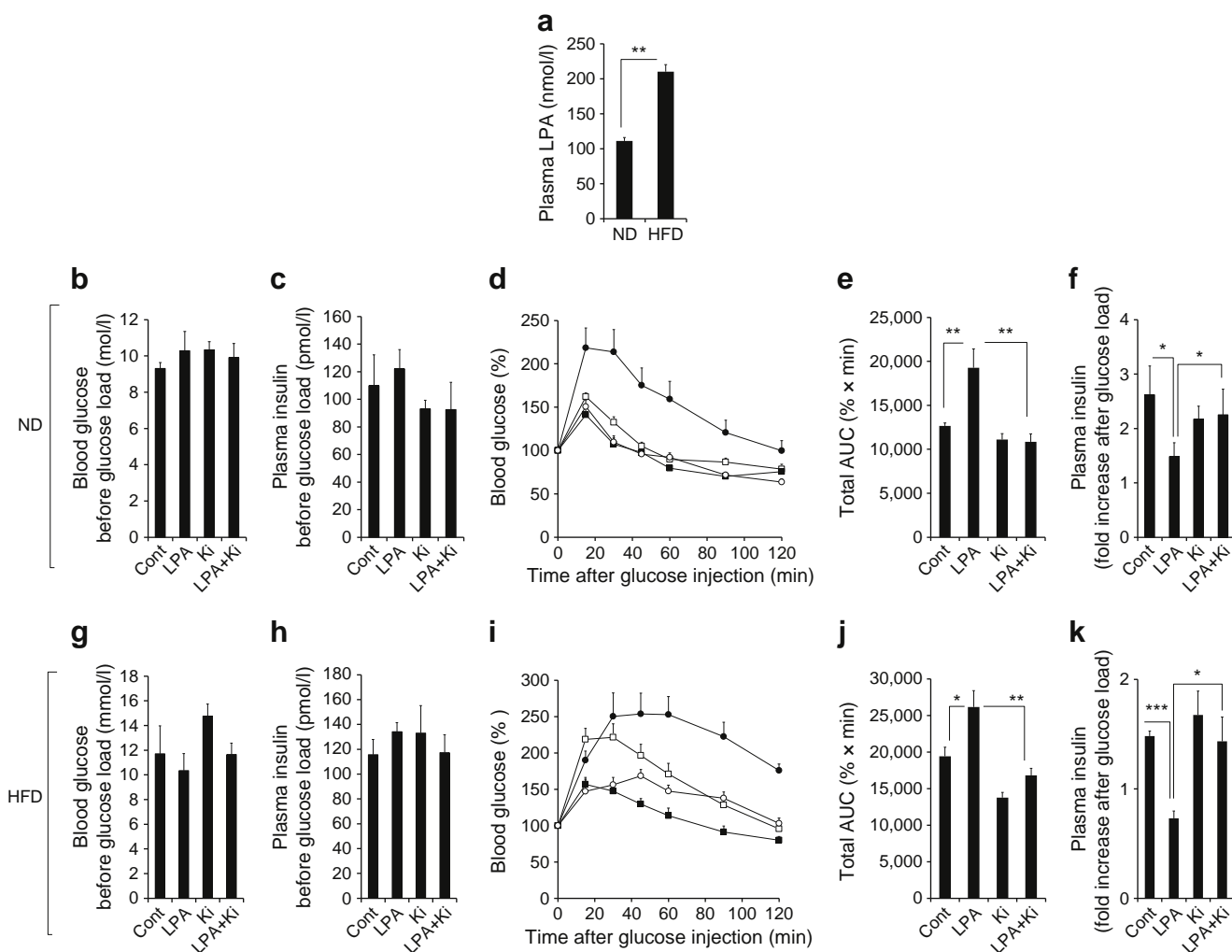


Fig. 1 Acute regulation of glucose tolerance by LPA and Ki16425 in ND and HFD mice. **(a)** Plasma LPA concentration in ND and HFD mice after 9 weeks of diet. **(b–k)** 7 h fasted ND **(b–f)** and HFD **(g–k)** mice received a single injection of LPA or vehicle (Cont) with or without a pre-injection of Ki16425 (Ki) administered 10 min before the LPA or vehicle. White squares, vehicle; black circles, LPA; black squares, Ki16425; white circles, LPA + Ki16425. After 30 min a

glucose tolerance test was conducted. Blood glucose **(b, g)** and plasma insulin **(c, h)** concentrations measured before glucose load. **(d, i)** Blood glucose concentration during the glucose tolerance test, expressed as per cent of concentration at time 0, and corresponding AUC **(e, j)**. **(f, k)** Fold change in plasma insulin from 15 min before to 15 min after glucose load. Values are means \pm SEM of four to six mice per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, comparing indicated values

Glucose and insulin tolerance tests Mice were fasted for 7 h before i.p. injection of glucose (1 g/kg) or insulin (0.75 U/kg). Blood from the tail vein was sampled before glucose load and every 15 min over 120 min to monitor glucose concentration. Plasma was collected 15 min before and after glucose injection to quantify insulin concentration. Glucose and insulin tolerance tests were conducted on separate groups of mice to limit the stress on the mice.

Body-fat-mass composition Fat and lean masses were determined by placing mice in a clear plastic holder, without anaesthesia or sedation, and inserting into the EchoMRI-3-in-1 system (Echo Medical Systems, Houston, TX, USA). The measure was performed 1 day before acute treatments

with LPA and Ki16425, and after chronic treatment with Ki16425.

Blood analysis Blood glucose was quantified using a glucose meter (Accu-Chek; Roche Diagnostic, Grenoble, France). Plasma insulin was quantified using a mouse insulin ELISA kit (Mercodia, Uppsala, Sweden). Plasma NEFA were measured using the enzymatic colorimetric Wako NEFA kit (Wako Chemicals, Neuss, Germany). Plasma triacylglycerols were measured using the enzymatic colorimetric PAP 150 Kit (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Plasma leptin and adiponectin were determined using Quantkine Immunoassays (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Plasma LPA was measured using a radioenzymatic assay as previously

described [19, 27]. Briefly, lipids were extracted from conditioned media or plasma with an equal volume of 1-butanol and evaporated. Extracted lipids were converted into [^{14}C]phosphatidic acid with recombinant LPA acyl-transferase in the presence of [^{14}C]oleoyl-CoA. The products of the reaction were extracted, separated by one-dimensional thin-layer chromatography and autoradiographed.

Organ triacylglycerol content Skeletal muscle and liver were homogenised and triacylglycerols were extracted from 500 μl homogenate using 2.5 ml chloroform/methanol (2:1 vol./vol.) and 1.2 ml KCl/HCl 2 mol/l was added. The organic phase was evaporated and solubilised in isopropyl alcohol, and triacylglycerols were quantified using an enzymatic colorimetric PAP 150 Kit (BioMerieux).

Organ glycogen content Skeletal muscle or liver was digested in NaOH (1 mol/l) and digestion was stopped with HCl (1 mol/l). Digestate was diluted in sodium acetate (1:4 vol./vol.) unsupplemented or supplemented with amyloglucosidase (500 U/ml) (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) and incubated at 55°C for 1 h to transform glycogen into glucose. Released glucose was quantified using an RTU kit (BioMerieux).

Glucose oxidation in ex vivo muscle Glucose oxidation was measured as previously described [28] with minor modifications. Red bundles from gastrocnemius muscle were incubated in modified Krebs–Henseleit (KH) buffer containing 0.2% fatty-acid-free BSA, 5 mmol/l glucose and 5,550 Bq/ml [^{14}C] glucose (PerkinElmer, Woodbridge, ON, Canada) for 60 min at 37°C in a sealed glass vial. At the end of the incubation, muscles were removed and homogenised in 800 μl lysis buffer to determine protein quantity. Oxidation was determined by acidifying the incubation buffer with 1 ml of H_2SO_4 1 mol/l, and the $^{14}\text{CO}_2$ was trapped by benzethonium hydroxide (Sigma-Aldrich) placed in a 0.5 ml microtube in the sealed glass vial. After 180 min, the microtube was removed and placed in a scintillation vial and radioactivity was counted (Cytoscint; MP Biomedicals, Illkirch, France).

Glucose transport in ex vivo muscle Glucose transport was measured as previously described [29]. Soleus muscles were isolated and preincubated for 10 min in KH buffer, pH 7.4, containing BSA (2 mg/ml), 2 mmol/l sodium pyruvate and 20 mmol/l HEPES. Muscles were then incubated for 45 min in the absence or the presence of insulin (100 nmol/l). For glucose transport, muscles were transferred into another vial containing KH medium supplemented with insulin, D-2-deoxyglucose (0.1 mmol/l) and 2-deoxy-D- ^3H glucose (14,800 Bq/ml) for 10 min. Muscles were then washed for 1 h in ice-cold PBS and dissolved in 1 mol/l NaOH for a period of 1 h. 2-Deoxy-D- ^3H glucose 6-phosphate and

2-deoxy-D- ^3H glucose were differentially precipitated by the use of zinc sulfate (0.3 mol/l), barium hydroxide (0.3 mol/l) and perchloric acid solutions (6%). Radioactivity of each precipitate was quantified in a liquid scintillation fluid.

Insulin secretion from isolated islets Insulin secretion from isolated islets was analysed as previously described [30]. Briefly, islets were isolated from mouse pancreas by collagenase digestion and separated from exocrine tissue by Histopaque gradient. Handpicked islets were placed at 37°C in RPMI medium containing 11 mmol/l glucose for overnight recovery and then distributed in 24-well plates (ten islets per well) for a starvation period of 2 h in RPMI containing 3 mmol/l glucose. Islets were then transferred into Krebs Ringer Bicarbonate HEPES buffer (KRBH) containing 3 mmol/l glucose and 0.07% BSA for a preincubation period of 45 min and then incubated for 1 h in KRBH medium supplemented with 0.5% BSA containing 3, 8 or 16 mmol/l glucose or 35 mmol/l KCl in the absence or presence of LPA (0.1, 1 and 5 $\mu\text{mol/l}$). Notice that incubation with KCl allows the measurement of insulin secretion due to complete depolarisation of the islets. The insulin released in incubation buffers was quantified using an AlphaLISA Human Insulin Research Immunoassay Kit (PerkinElmer) and human standards at the Imaging and Cell Biology Core Facility of the Centre de Recherche du CHUM. Total islet insulin content was measured after acid–ethanol (1.5% HCl, 75% ethanol) extraction.

Histological analysis of pancreas Immediately after dissection, a piece of pancreas was fixed for 24 h in formalin 4%, then maintained at 4°C in 70% ethanol until paraffin embedding and sectioned into sections, 5 μm thick. Sections were stained with haematoxylin and eosin. An image of the entire slice was performed with NanoZoomer Digital Pathology Image (Hamamatsu [v1.2], Hamamatsu City, Japan) and then analysed with NDP scan 2.5.80 from Hamamatsu to count islet number and the number of cells per islet, and to measure islet area and the total analysed sample area.

mRNA quantification Total RNAs were extracted from tissues and cells using the RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA (500 ng) was reverse transcribed for 60 min at 37°C using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, St Aubin, France) in the presence of random hexamers. A minus reverse transcriptase (RT) reaction was performed in parallel to ensure the absence of genomic DNA contamination. Real-time PCR was performed on 12.5 ng cDNA and 100–900 nmol/l specific oligonucleotide primers in a final volume of 20 μl using the Mesa blue QPCR Master Mix for Sybr (Eurogentec, Angers, France). Fluorescence was monitored and analysed in a StepOnePlus Real-Time PCR system instrument (Applied Biosystems, St Aubin, France).

18S RNA was used to normalise gene expression according to the following formula $2^{-(Ct_{18S} - Ct_{gene})}$ where Ct corresponds to the number of cycles needed to generate a fluorescent signal above a predefined threshold. Oligonucleotide primers were designed using the Primer Express software (Applied Biosystems). The sequence of the oligonucleotide primers is listed in electronic supplementary material [ESM] Table 1.

Statistics Data are presented as means \pm SEM. Bilateral Student's *t* tests were used to compare two groups of data. A two-way ANOVA was applied to detect interaction between treatment and time. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

LPA acutely impairs glucose disposal through inhibition of glucose-induced insulin secretion After 9 weeks of diet, HFD mice were obese and prediabetic (see **Methods**). HFD mice also showed a significantly higher (1.9-fold) plasma LPA concentration than ND fed mice (Fig. 1a). This was in agreement with our previous report [19]. To investigate the possible involvement of LPA in the glucose intolerance of HFD mice, glucose tolerance tests were performed 30 min after a single injection of LPA. In both ND and HFD mice, LPA did not modify basal glycaemia (Cont vs LPA, Fig. 1b vs g) and insulinaemia (Cont vs LPA Fig. 1c vs h) measured before glucose load. This indicated that LPA had no direct impact on these variables. Nevertheless, LPA potently impaired glucose tolerance when compared with control (Cont vs LPA, Fig. 1d, e and i, j). Pre-injection of Ki16425, 10 min before LPA, completely blocked the deleterious effect of LPA on glucose tolerance (LPA vs LPA + Ki, Fig. 1d, e and i, j). These data revealed that exogenous LPA exerts a deleterious effect on glucose tolerance through an LPA-receptor-dependent mechanism.

Interestingly, whereas injection of Ki16425 alone did not significantly influence glucose tolerance in ND mice (Cont vs Ki, Fig. 1d, e), it significantly improved glucose tolerance in HFD mice (Cont vs Ki, Fig. 1i, j). This specific beneficial effect of Ki16425 was compared with the higher concentration of plasma LPA in HFD mice than in ND mice (Fig. 1a). These data strongly suggested that enhanced endogenous production of LPA in HFD mice participates in their impaired glucose tolerance.

In an attempt to understand the mechanisms responsible for LPA-mediated impairment of glucose tolerance, plasma insulin was measured during the glucose tolerance test. In both ND and HFD mice, LPA significantly attenuated the induction of insulinaemia generated by the glucose bolus (Cont vs LPA Fig. 1f, k). LPA-mediated inhibition of plasma insulin was completely blocked by pre-injection of Ki16425

(LPA vs LPA + Ki, Fig. 1f, k). In parallel, insulin tolerance was not significantly altered after injection of LPA or Ki16425 (ESM Fig. 1), suggesting no impact on insulin sensitivity. These data demonstrated that LPA-induced impairment of glucose tolerance resulted from inhibition of glucose-induced insulin secretion rather than alteration of insulin sensitivity. In vitro, LPA dose-dependently inhibited glucose-induced insulin secretion by isolated mouse islets (ESM Fig. 2). In contrast, LPA had no influence on basal insulin secretion or on depolarisation-induced insulin secretion by KCl (ESM Fig. 2). A direct impact of LPA on the islets could thus be responsible for its inhibitory influence on glucose-induced insulinaemia.

Chronic treatment with Ki16425 improves glucose tolerance in HFD mice We then investigated whether the beneficial effect of Ki16425 on glucose homeostasis in HFD mice could persist over time. In contrast to the observations made after 30 min, at 24 h after a single injection of Ki16425 glucose tolerance was no more improved when compared with control (ESM Fig. 3). This showed that the beneficial effect of a single injection of Ki16425 on glucose tolerance was transient.

We then examined the effect of chronic treatment with Ki16425 (3 weeks of daily injections). Such treatment had no significant influence on body weight, fat mass or adipose tissue weight (Table 1). Ki16425 treatment had no influence on basal glycaemia preceding the glucose tolerance test (Fig. 2a) but a slight increase in basal insulinaemia was noticed (although the difference did not reach significance) (Fig. 2b). Interestingly, glucose tolerance tests revealed that Ki16425-treatment significantly improved glucose tolerance when compared with control (Fig. 2c, d). This was associated with no significant change in glucose-induced increase in plasma insulin (Fig. 2e). After overnight fasting, Ki16425-treated mice showed no significant change in glycaemia (Fig. 2f) but insulinaemia was significantly higher than in control mice (Fig. 2g). These results showed that chronic treatment with Ki16425 persistently improved the glucose tolerance of HFD mice. This beneficial effect of Ki16425 had no consequence on fasting glycaemia but was surprisingly associated with an increase in fasting insulinaemia, suggesting a possible impact on pancreas function.

To test this hypothesis, the pancreas was examined. Histological analysis of the pancreas from Ki16425-treated mice revealed a significantly higher number of islets when compared with control mice (Fig. 3a; representative scan is shown in ESM Fig. 4). In contrast, the size of the islets (Fig. 3b) and the number of cells per islet (Fig. 3c) remained unchanged. Moreover, no change in the expression of genes involved in beta cell function (insulin, *Pdx1*, *Gck* and *Glut2* [also known as *Slc2a2*]) was observed (Fig. 3d). These results showed that chronic treatment of HFD mice with Ki16425 increased the total number of islet cells suggesting that a compensatory behaviour of the endocrine pancreas

Table 1 Effect of chronic treatment with Ki16425 on HFD-fed mice

Variable	Control (n=6)	Ki16425 (n=6)
Body weight (g)	34.3±2.3	32.4±1.4
Body fat mass (% of total body weight)	34.1±0.5	37.4±1.1
Body lean mass (% of total body weight)	56.6±0.7	57.7±0.9
Subcutaneous adipose tissue (mg)	969±27	1,269±258
Perigonadal adipose tissue (mg)	1,711±198	1,583±292
Pancreas (mg)	249±32	202±17
Liver (mg)	1,136±78	1,051±97
Gastrocnemius muscle (mg)	341±17	359±19
Soleus muscle (mg)	20±1	19±2
Fasted liver triacylglycerols (mg/[g protein])	1.51±0.28	2.07±0.34
Fasted muscle triacylglycerols (mg/[g protein])	7.55±0.67	7.92±1.80
Fasted muscle glycogen (mg/[g protein])	14.7±3.5	14.3±2.5

Data are means ± SEM

might be responsible for Ki16425-mediated increase in fasting insulinaemia.

Chronic treatment with Ki16425 improves insulin tolerance in HFD mice and increases liver glycogen content To investigate the influence of Ki16425 on glucose homeostasis, insulin tolerance tests were performed in HFD mice. Chronic treatment with Ki16425 led to a significant improvement in insulin tolerance when compared with control vehicle (Fig. 4a, b). The decline in blood glucose concentration between 0 and 60 min following insulin injection was faster in Ki16425-treated mice than in vehicle-treated control mice suggesting a better insulin sensitivity. Interestingly, control glycaemia increased again after 60 min, reflecting endogenous glucose production, whereas in Ki16425-treated mice glycaemia stayed at a low level (Fig. 4a). These observations suggest that Ki16425 has an impact on liver glucose metabolism.

To test this hypothesis, livers were examined. Ki16425-treated mice showed no change in liver weight (Table 1) or

triacylglycerol content (Table 1). In contrast, Ki16425-treated mice displayed a significant increase in liver glycogen content when compared with vehicle-treated control mice; this was observed in overnight fasted mice as well as after 18 h re-feeding (Fig. 4c). Glycogen content results from a balance between synthesis and degradation. Livers from Ki16425-treated mice displayed higher gene expression of *Gck* (involved in glucose uptake) and lower expression of *G6pase* (also known as *G6pc*) and *Pepck* (also known as *Pck1*, involved in glucose production) when compared with control mice (Fig. 4d). A trend towards a reduced expression of *Gyk* (involved in neoglucogenesis) was also observed but did not reach significance ($p=0.08$) (Fig. 4d). Although we are aware of the limitations in the functional conclusions that can be drawn from mRNA measurements, these results suggested that Ki16425-mediated increase in liver glycogen content might result from a reduction in glucose release and an increase in glucose uptake in liver. These changes might explain, at least in part, Ki16425-mediated improvement of insulin tolerance and could also

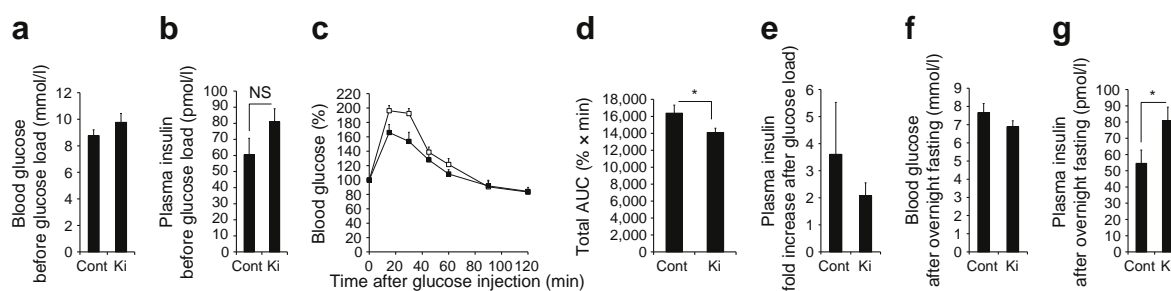


Fig. 2 Chronic treatment with Ki16425 improves glucose tolerance in HFD mice. After 9 weeks of diet, HFD mice received daily injections of Ki16425 (Ki) or vehicle (Cont) for 3 weeks. Mice were fasted for 7 h before conducting a glucose tolerance test. Blood glucose (a) and plasma insulin (b) concentrations measured before glucose load. (c) Blood glucose concentration during glucose tolerance tests, expressed

as per cent of concentration at time 0, and corresponding AUC (d). White squares, vehicle; black squares, Ki16425. (e) Fold change in plasma insulin from 15 min before to 15 min after glucose load. Blood glucose (f) and plasma insulin (g) concentrations after overnight fasting. Values are means ± SEM of six to 12 mice per group. NS, $p=0.072$; $*p<0.05$, comparing indicated values

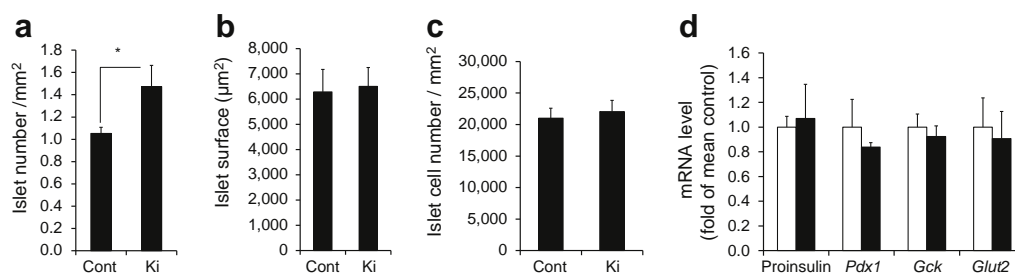


Fig. 3 Chronic treatment with Ki16425 increases islet cell number in HFD mice. HFD mice were treated as described in the legend for Fig. 2, and pancreas was analysed after overnight fasting. Islet number (a), islet surface (b) and number of cells per islet (c) were determined

by histomorphology. Representative scans are shown in ESM Fig. 3. (d) Gene expression in whole pancreas from HFD mice; white bars, vehicle; black bars, Ki16425. Values are means \pm SEM of six to 12 mice per group. * p <0.05, comparing indicated values

contribute to Ki16425-mediated improvement in glucose tolerance.

Chronic treatment with Ki16425 increases glucose use in skeletal muscle Since skeletal muscles play a crucial role in glucose homeostasis, they were also examined after chronic treatment with Ki16425. Neither their weight nor their glycogen and triacylglycerol contents were modified (Table 1). Nevertheless, soleus muscle gene expression analysis

showed a significant increase in *Glut1* (also known as *Slc2a1*) and *Hk2*, but not *Glut4* (also known as *Slc2a4*) mRNAs (Fig. 5a). Although we are aware of the limitations in the functional conclusions that can be drawn from mRNA measurements, these results suggested a change in glucose transport. In ex vivo muscles, a slight increase in 2-deoxy-D-[3 H]glucose transport was indeed observed, but the difference did not reach significance (Fig. 5b). Nevertheless, a significant increase in $^{14}\text{CO}_2$ production from [^{14}C]glucose

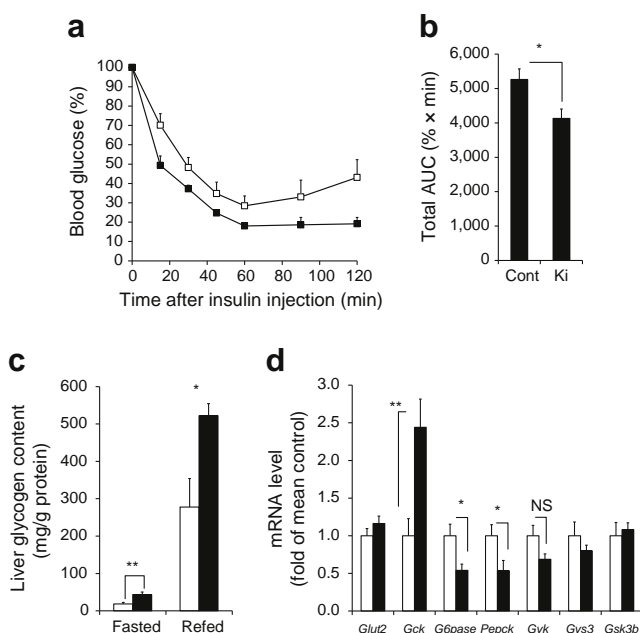


Fig. 4 Chronic treatment with Ki16425 improves insulin tolerance and increases liver glycogen content in HFD mice. HFD mice were treated as described in the legend for Fig. 2, and insulin tolerance tests were conducted after 7 h fasting. (a) Blood glucose concentration during glucose tolerance tests, expressed as per cent of concentration at time 0, and corresponding AUC (b). White squares, vehicle; black squares, Ki16425. (c) Glycogen content after overnight fasting (Fasted) and 18 h after re-feeding (Refed). (d) Gene expression of fasted mice. Values are means \pm SEM of six mice per group; white bars, vehicle; black bars, Ki16425. NS, p =0.08; * p <0.05 and ** p <0.01, comparing indicated values

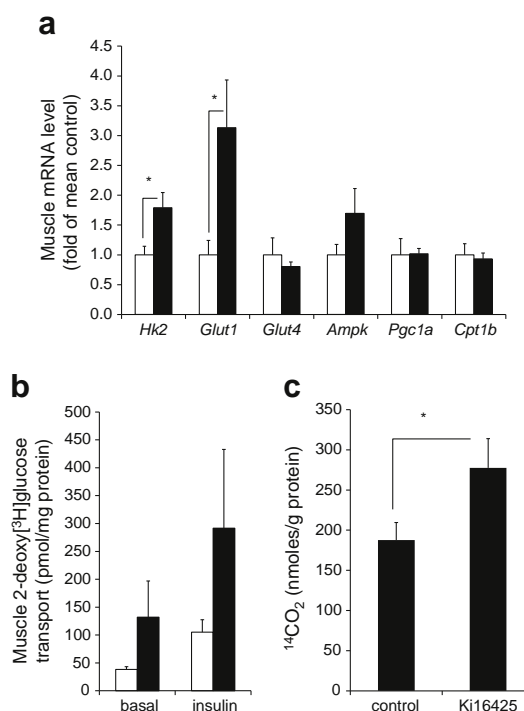


Fig. 5 Influence of mid-term chronic treatment with Ki16425 on glucose metabolism in skeletal muscle of HFD mice. HFD mice were treated as described in the legend to Fig. 2 before quantifying gene expression (a) and measuring 2-deoxy[3 H]glucose transport (b) and [^{14}C]glucose oxidation (c) in ex vivo muscle; white bars, vehicle; black bars, Ki16425. Values are means \pm SEM of six to 12 mice per group. * p <0.05, comparing indicated values

in ex vivo muscle was observed in Ki16425-treated mice when compared with vehicle-treated control mice (Fig. 5c). Although one should remain cautious about extrapolating ex vivo observations to the in vivo situation, our results nevertheless suggested that chronic treatment of HFD-fed mice with Ki16425 could enhance glucose oxidation in muscle and this might contribute, at least in part, to Ki16425-mediated improvement in glucose tolerance.

Discussion

The objective of this work was to study the involvement of LPA in glucose intolerance associated with obesity. We previously reported that transgenic-mediated reduction of LPA synthesis was associated with improved glucose tolerance in HFD-fed mice [19], suggesting that LPA has a negative impact on glucose homeostasis. Here we strengthened this hypothesis by showing the deleterious effect of LPA on glucose tolerance through inhibition of insulin secretion and we demonstrated that chronic pharmacological blockade of LPA receptors with Ki16425 can reverse the deterioration in glucose homeostasis in HFD obese prediabetic mice.

We first showed that acute injection of LPA leads to a strong impairment of glucose tolerance. This observation clearly demonstrates a direct negative influence of LPA on glucose tolerance. This effect is mediated by LPA receptors since the antagonist Ki16425 blocks it. The deleterious effect of LPA was associated with inhibition of glucose-induced insulin secretion with no change in insulin tolerance. These observations strongly suggest that the acute deleterious impact of LPA on glucose tolerance is mediated by inhibition of insulin secretion rather than by an alteration of insulin sensitivity. Moreover, in vitro experiments show that LPA dose-dependently inhibited glucose-induced insulin secretion, directly on isolated islets. This is not in agreement with the findings of Metz et al [31] who reported that glucose-induced insulin secretion was not influenced by LPA in isolated rat islets. Whereas species differences in islet sensitivity to LPA could explain this discrepancy, the way LPA is presented to the islets should also be taken into account. Whereas in our work, LPA was brought to islets in solution in an albumin-containing buffer, Metz et al used an albumin-free vehicle [31]. The latter is not favourable to LPA solubility or its presentation to receptors [32].

Our data also show that inhibition of glucose tolerance is not limited to exogenous LPA and can be extended to endogenous LPA. LPA plasma concentration is higher in HFD mice than in ND mice, and we found that Ki16425 improves glucose tolerance by itself in HFD mice but not in ND mice. Having demonstrated the deleterious effect of exogenous LPA on glucose tolerance, the most likely explanation is that overproduction of endogenous LPA in HFD mice exerts a tonic

inhibitory effect on glucose tolerance that can be alleviated by blocking LPA receptors. Such a conclusion is close to that drawn from our previous report [19] showing that deletion of the LPA-synthesising enzyme autotaxin in adipose tissue was associated with an improvement in glucose tolerance in HFD mice but not in ND mice. Therefore, blocking LPA synthesis or LPA receptors leads to the same metabolic alterations. Increased LPA synthesis in HFD obese mice very likely participates in the deterioration of their glucose tolerance. LPA can therefore be considered to play an important part in the onset of obesity-associated impairment of glucose homeostasis. Thus, autotaxin and LPA receptors represent possible valuable targets for the treatment of metabolic disorders associated with obesity.

We also found that chronic treatment of HFD mice with Ki16425 improved insulin tolerance, increased liver glycogen storage and increased the capacity of muscle to oxidise glucose. These changes are obvious signs of a better disposal of glucose in peripheral organs and are very likely responsible for Ki16425-induced improvement of glucose tolerance. Nevertheless, chronic treatment with Ki16425 also increases fasting insulin. This was initially intriguing to us since increased insulinaemia is usually associated with insulin resistance. It is well established that HFD obesity leads, after a compensatory phase, to progressive beta cell degeneration responsible, at least in part, for the deregulation of insulin production associated with obesity [33]. Histological analysis of the pancreas revealed that the number of pancreatic islets cells was higher in Ki1625-treated mice than in vehicle-treated control mice. Assuming that more than 95% of the cells present in islets are beta cells, it can be concluded that the effect of Ki16425 on the number of beta cells could explain, at least in part, the observed increased in fasting insulin. The influence of Ki16425 on plasma insulin might therefore be interpreted as a protective action against HFD-mediated alteration of beta cells. Nevertheless, we noticed no change in proinsulin mRNA expression, so a possible impact of Ki16425 on the secreting activity of beta cells cannot be excluded. Increased insulin production is recognised as a compensatory mechanism intended to maintain glycaemia when peripheral insulin sensitivity is altered. One can thus propose that the influence of Ki16425 on insulinaemia contributes to Ki16425-mediated improvement in glucose disposal. A possible mechanism could be that increased insulinaemia has an impact on the expression of genes positively involved in glucose homeostasis. This hypothesis is supported by our results showing that Ki16425 treatment affected the expression of several insulin-sensitive genes such as *Gck*, *G6pase* and *Pepck*.

In conclusion, this work presents strong evidence for the role of LPA as a deleterious lipid mediator involved in the deterioration of glucose homeostasis associated with obesity. Moreover, the demonstration of the beneficial effects of the antagonist Ki16425 indicates that LPA receptors might represent potential interesting pharmacological targets to prevent and/or treat the metabolic defects associated with obesity.

Acknowledgements We thank I. Castan-Laurell, V. Bourlier and C. Moro (Inserm U1048, Toulouse, France) and J. Boucher (Joslin Institute, Harvard University, Boston, MA, USA) for fruitful discussions and reviewing the manuscript. We also thank F. Capilla from the service of Histopathology (Inserm US006 CREFRE, Toulouse, France) for her very helpful technical assistance. M. Prentki is the recipient of the Canada research chair in diabetes and metabolism. C. Rancoule is supported by a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie (France). C. Attané is supported by a postdoctoral fellowship from the Canadian Diabetes Association.

Funding This work was supported by grants from Inserm (to J. S. Saulnier-Blache) and the Fondation pour la Recherche Médicale (grant no. DRM20101220459) (to J. S. Saulnier-Blache) and the Canadian Institute of Health Research (to M. Prentki).

Duality of interest The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

Contribution statement All authors participated in the conception and design, or analysis and interpretation of the data, contributed to drafting and revising the manuscript, and gave final approval of the version to be published.

References

- Lee MJ, Wu Y, Fried SK (2010) Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13:371–376
- Gutierrez DA, Puglisi MJ, Hastay AH (2009) Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr Diabetes Rep* 9:26–32
- Karastergiou K, Mohamed-Ali V (2010) The autocrine and paracrine roles of adipokines. *Mol Cell Endocrinol* 318:69–78
- Choi JW, Herr DR, Noguchi K et al (2010) LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:157–186
- Boutin JA, Ferry G (2009) Autotaxin. *Cell Mol Life Sci* 66:3009–3021
- Nakanaga K, Hama K, Aoki J (2010) Autotaxin – an LPA producing enzyme with diverse functions. *J Biochem* 148:13–24
- Kano K, Arima N, Ohgami M, Aoki J (2008) LPA and its analogs – attractive tools for elucidation of LPA biology and drug development. *Curr Med Chem* 15:2122–2131
- Im DS (2010) Pharmacological tools for lysophospholipid GPCRs: development of agonists and antagonists for LPA and S1P receptors. *Acta Pharmacol Sin* 31:1213–1222
- Rancoule C, Pradere JP, Gonzalez J et al (2011) Lysophosphatidic acid-1-receptor targeting agents for fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs* 20:657–667
- Ohta H, Sato K, Murata N et al (2003) Ki16425, a subtype-selective antagonist for EDG-family lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol* 64:994–1005
- Boucharaba A, Serre CM, Guglielmi J, Bordet JC, Clezardin P, Peyruchaud O (2006) The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9643–9648
- Pradere JP, Klein J, Gres S et al (2007) LPA1 receptor activation promotes renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 18:3110–3118
- Zhou Z, Subramanian P, Sevilimis G et al (2011) Lipoprotein-derived lysophosphatidic acid promotes atherosclerosis by releasing CXCL1 from the endothelium. *Cell Metab* 13:592–600
- Valet P, Pages C, Jeannot O et al (1998) Alpha2-adrenergic receptor-mediated release of lysophosphatidic acid by adipocytes. A paracrine signal for preadipocyte growth. *J Clin Invest* 101:1431–1438
- Gesta S, Simon MF, Rey A et al (2002) Secretion of a lysophospholipase D activity by adipocytes: involvement in lysophosphatidic acid synthesis. *J Lipid Res* 43:904–910
- Ferry G, Tellier E, Try A et al (2003) Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J Biol Chem* 278:18162–18169
- Boucher J, Quilliot D, Praderes JP et al (2005) Potential involvement of adipocyte insulin resistance in obesity-associated up-regulation of adipocyte lysophospholipase D/autotaxin expression. *Diabetologia* 48:569–577
- Rancoule C, Dusaucy R, Treguer K et al (2012) Depot-specific regulation of autotaxin with obesity in human adipose tissue. *J Physiol Biochem* 68:635–644
- Dusaucy R, Rancoule C, Gres S et al (2011) Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid. *J Lipid Res* 52:1247–1255
- Simon MF, Daviaud D, Pradere JP et al (2005) Lysophosphatidic acid inhibits adipocyte differentiation via lysophosphatidic acid 1 receptor-dependent down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. *J Biol Chem* 280:14656–14662
- Coy PE, Taneja N, Lee I, Hecquet C, Bryson JM, Robey RB (2002) LPA is a novel lipid regulator of mesangial cell hexokinase activity and HKII isoform expression. *Am J Physiol Ren Physiol* 283:F271–F279
- Keller JN, Steiner MR, Mattson MP, Steiner SM (1996) Lysophosphatidic acid decreases glutamate and glucose uptake by astrocytes. *J Neurochem* 67:2300–2305
- Yea K, Kim J, Lim S et al (2008) Lysophosphatidic acid regulates blood glucose by stimulating myotube and adipocyte glucose uptake. *J Mol Med* 86:211–220
- Fan H, Zingarelli B, Harris V, Tempel GE, Halushka PV, Cook JA (2008) Lysophosphatidic acid inhibits bacterial endotoxin-induced pro-inflammatory response: potential anti-inflammatory signaling pathways. *Mol Med* 14:422–428
- Hashimoto T, Ohata H, Momose K (2004) Itch-scratch responses induced by lysophosphatidic acid in mice. *Pharmacology* 72:51–56
- Subramanian P, Karshovska E, Reinhard P et al (2010) Lysophosphatidic acid receptors LPA1 and LPA3 promote CXCL12-mediated smooth muscle progenitor cell recruitment in neointima formation. *Circ Res* 107:96–105
- Saulnier-Blache JS, Girard A, Simon MF, Lafontan M, Valet P (2000) A simple and highly sensitive radioenzymatic assay for lysophosphatidic acid quantification. *J Lipid Res* 41:1947–1951
- Nahle Z, Hsieh M, Pietka T et al (2008) CD36-dependent regulation of muscle FoxO1 and PDK4 in the PPAR delta/beta-mediated adaptation to metabolic stress. *J Biol Chem* 283:14317–14326
- Dray C, Knauf C, Daviaud D et al (2008) Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 8:437–445
- Peyot ML, Guay C, Latour MG et al (2009) Adipose triglyceride lipase is implicated in fuel- and non-fuel-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 284:16848–16859
- Metz SA (1986) Lysophosphatidylinositol, but not lysophosphatidic acid, stimulates insulin release. A possible role for phospholipase A2 but not de novo synthesis of lysophospholipid in pancreatic islet function. *Biochem Biophys Res Commun* 138:720–727
- Hama K, Bandoh K, Kakehi Y, Aoki J, Arai H (2002) Lysophosphatidic acid (LPA) receptors are activated differentially by biological fluids: possible role of LPA-binding proteins in activation of LPA receptors. *FEBS Lett* 523:187–192
- Nolan CJ, Damm P, Prentki M (2011) Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet* 378:169–181

- **Principales observations et commentaires**

Le LPA bloque la sécrétion d'insuline induite par le glucose

Dans cet article, nous avons mis en évidence que, chez des souris non-obèses, l'injection de LPA induit de façon transitoire mais puissante une intolérance au glucose, associée à un blocage de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Cet effet est dépendant des récepteurs au LPA (1 et/ou 3). Il serait intéressant de réaliser maintenant un protocole utilisant un antagoniste spécifique des récepteurs LPA1 pour discriminer lequel des 2 récepteurs est impliqué dans ces effets.

Pour valider un effet direct du LPA sur le pancréas, nous avons montré, *in vitro*, que le LPA était capable, de façon dose-dépendante, de bloquer la sécrétion d'insuline induite par le glucose par des ilots pancréatiques murins isolés. Il faut maintenant comprendre les mécanismes d'actions possibles du LPA sur le pancréas. Il est à noter qu'*in vivo* à jeun le LPA n'influence pas l'insulinémie et par conséquent la glycémie. Cet effet sur l'insulinémie n'est observé qu'en situation d'augmentation de la glycémie (lors du test de tolérance au glucose) mais aussi en situation nourrie dans un **protocole complémentaire (2)** à cet article. De la même façon, *ex vivo*, dans notre étude sur les ilots isolés, le LPA n'a aucun impact sur la sécrétion basale d'insuline. Ces données suggèrent que le LPA n'agit pas sur les stocks d'insuline, sa production, ou sur les vésicules, mais sur l'un des mécanismes qui stimule sa sécrétion.

- Une régulation de l'expression génique de GLUT2 au niveau des ilots β du pancréas semble un mécanisme peu probable, car la réponse observée dans ce test est aigue et rapide.

- Le LPA pourrait bloquer la dépolarisation de la membrane à l'origine de la sécrétion de l'insuline, comme le font les sulfonylurées ou les glinides qui elles agissent sur les canaux K/ATP⁺. Cet effet pourrait passer par la protéine Gi, couplée aux récepteurs au LPA. En effet il a été montré que certains RCPG, en activant Gs ou Gi régulaient l'adénylate cyclase, et par conséquent les taux d'AMPc qui eux même régulent la sécrétion d'insuline (voir chapitre correspondant de la revue bibliographique). En effet, augmenter les taux d'AMPc (avec par exemple : agoniste β -adrénergiques, inhibiteurs phosphodiésterases ou le glucagon), augmente la sécrétion d'insuline, en augmentant les taux de calcium intracellulaires alors

qu'en les diminuant (avec des agonistes α -adrénergique par exemple) cela bloque cette sécrétion [17]. Le LPA, en se fixant à son récepteur pourrait activer G_i , inhiber la cyclase, diminuer les taux d'AMPc est ainsi bloquer la sécrétion d'insuline. Cette hypothèse serait intéressante à développer dans le futur.

- Cet effet du LPA sur la dépolarisation de la membrane pourrait également passer par une voie récemment décrite: Rho/ROCK. En effet, le LPA active la voie ROCK [111, 213, 215] et d'autre part ROCK peut inhiber la sécrétion d'insuline en bloquant l'exocytose induite par le K^+ [144]. Dans cette vue, il serait intéressant de tester l'activation de ROCK par le LPA au niveau des cellules β en utilisant, par exemple, des inhibiteurs de ROCK tels qu'H-1152 et Y-27632. Le fait que les inhibiteurs de ROCK régulent uniquement la sécrétion insulinique stimulée par le glucose (et non la sécrétion basale), comme ce que l'on retrouve dans notre modèle, appuie cette hypothèse [144].

- Enfin, nous proposons une autre hypothèse: l'effet du LPA sur la sécrétion d'insuline pourrait dépendre des récepteurs TRPV1. En effet, le LPA peut activer directement le récepteur vanilloïde canal à cations, TRPV1 [265]. C'est une nouvelle piste d'étude que l'on développe actuellement au laboratoire. En effet, la capsaïcine, connue pour activer TRPV1, induit des effets similaires à ceux du LPA: hypothermie et nociception. Les effets nociceptifs du LPA sont bien connus aujourd'hui, et lors de ma thèse, j'ai mis en évidence, de façon fortuite, un puissant effet hypothermiant (**protocole complémentaire 3**) qui m'a mis sur la piste d'une voie TRPV1. L'implication de TRPV1 dans les effets pro-nociceptifs du LPA ont d'ailleurs été mis en évidence récemment [287]. De plus, il a été montré que l'administration de capsaïcine en ip, induit comme l'administration de LPA, une gluco-intolérance transitoire [343]. Les effets de TRPV1 sur la sécrétion d'insuline sont encore controversés, cependant, il a été mis en évidence que l'activation de TRPV1 induisait une augmentation de CGRP (calcitonine gene related peptide) [134], et il est connu que CGRP, au niveau des ilots pancréatiques, inhibe la sécrétion d'insuline [295, 296]. De plus, l'activation de TRPV1 induit une hypothermie, ce qui, indirectement, peut bloquer la sécrétion d'insuline [229]. Nous cherchons maintenant à savoir si l'effet du LPA sur le pancréas pourrait passer par une activation de TRPV1. Pour cela il serait intéressant de regarder la sécrétion d'insuline en réponse au glucose chez des souris TRPV1 $^{-/-}$ ou traitées avec un antagoniste de TRPV1. Cette étude a été lancée. Pour cela, nous avons utilisé un antagoniste TRPV1 : l'AMG9810, que nous administrons avant le LPA pour voir s'il pourrait bloquer son effet. Les premières données ne sont pas concluantes. Il faudrait relancer ces études avec une cinétique et des

doses différentes. De plus, dans la cellule β pancréatique, de multiples TRP sont exprimés et divers TRP sont impliqués dans la sécrétion d'insuline [41, 177, 286, 374]. Il serait peut être aussi intéressant de cibler d'autres TRP.

Effet hyperglycémiant du LPA, d'autres pistes ?

Les études *ex vivo* ont mis en évidence que le LPA a un effet direct sur le pancréas, ce qui conduit à un effet délétère sur la tolérance au glucose. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que l'effet délétère du LPA puisse passer par son action sur d'autres organes que le pancréas. Il a été montré que le LPA augmentait le transport du glucose au niveau de cellules musculaires et adipeuses [424], ce qui suggère que l'effet systémique du LPA sur la tolérance au glucose ne résulte pas d'un effet direct sur le muscle ou le tissu adipeux. Par contre, il a été mis en évidence que le LPA pouvait activer la glycogénolyse au niveau d'hépatocytes en culture [169], suggérant que l'une des autres cibles du LPA, après le pancréas puisse être le foie. Nous avons alors réalisé un **protocole complémentaire 2**. Lors d'une injection de LPA (50mg/kg, ip) chez des souris nourries, on observe une diminution de l'insulinémie, associée à une augmentation de la glycémie. Cette augmentation de la glycémie peut être due à la chute de l'insulinémie et donc un moindre stockage des sucres, mais aussi à une augmentation de la libération hépatique de glucose, notamment permise par la glycogénolyse. Nous avons donc, 120 min après l'injection du LPA, regardé les taux de glycogène hépatique. L'injection n'a aucun effet sur les taux de glycogène. Cela suggère que le LPA *in vivo*, à notre dose, induit une hyperglycémie sans impacter sur les taux de glycogène hépatiques. Le foie est capable de libérer du glucose dans la circulation sanguine par une autre voie : la néoglucogenèse. Il serait intéressant de déterminer si le LPA agit sur la néoglucogenèse hépatique. Pour cela, le LPA ou son véhicule, pourraient être injectés 30 min avant un test de tolérance au pyruvate.

Injection ip de LPA, effet local ou systémique ?

L'augmentation des taux de LPA, par administration exogène, induit un effet délétère sur le métabolisme glucidique. Il serait intéressant de voir si l'administration de 50mg/kg de LPA conduit à une variation physiologique ou physiopathologique du LPA sanguin, comme en situation d'obésité où les taux sont environ doublés. Pour répondre à cette question nous avons récupéré du plasma, à la queue des souris 5 et 20min après l'injection de cette dose de

LPA, puis nous avons dosé le LPA. A ces temps là, l'injection n'a pas permis de modifier les taux circulants de LPA. Nous pouvons alors imaginer que le LPA ne diffuse pas au delà de la sphère péritonéale, ne passe pas en systémique et agisse de façon locale. Un protocole de traitement chronique au LPA (4 jours) va dans le sens de cette hypothèse. En effet, nous avons regardé l'apparition d'effets pro-fibrosants du LPA (partie résultats 3) après injection ip et nous avons pu noter un effet uniquement sur les tissu intra-péritonéaux (voir **protocole complémentaire 4**).

Hyper-insulinémie à jeun et meilleure sensibilité à l'insuline

Les observations de la partie aigue de cet article suggèrent que l'augmentation des taux plasmatiques de LPA lors de l'obésité ait un effet délétère sur l'homéostasie glucidique, notamment via une inhibition de la sécrétion insulinique stimulée par le glucose. De façon cohérente, le blocage pharmacologique (Ki16425) de l'axe ATX/LPA induit une augmentation de l'insulinémie à jeun. Ce protocole est le même que celui du **protocole complémentaire 1** mais, pour les études sur le métabolisme, nous avons réalisé nos analyses après 3 semaines de traitement, période où le métabolisme est impacté pas la masse grasse. Cette augmentation de l'insulinémie, uniquement chez la souris à jeun (la tendance inverse est retrouvée chez les animaux nourris) est en apparente contradiction avec l'amélioration de la résistance au glucose et à l'insuline de ces animaux. Ce phénotype est également associé à un meilleur stockage glucidique au niveau du foie, ainsi qu'à un transport glucidique basal et une oxydation du glucose augmentés dans le muscle. On peut alors imaginer que cette légère augmentation de l'insulinémie à jeun, chez les souris traitées au Ki16425, comparativement aux souris contrôles, permette l'augmentation de l'expression de certains gènes régulés par l'insuline, et qui vont être à l'origine de cette utilisation du glucose augmentée. L'insuline, induit le stockage du glucose, mais aussi une moindre libération (libération hépatique en grande majorité). Dans notre protocole, on retrouve dans les foies des souris traitées au Ki16425 une diminution de l'expression de gènes impliqués dans le relargage hépatique de glucose (glucose6phosphatase, phosphoénol pyruvate carboxy kinase et glycérol kinase). De plus, lors du test de tolérance à l'insuline, la glycémie des animaux traités au Ki16425 après 120min n'est toujours pas remontée, contrairement à celle des souris contrôles. Ces données sont cohérentes avec l'augmentation des taux de glycogènes hépatiques (environ 2 fois plus forts, que ce soit en conditions à jeun ou nourries). Non seulement le foie stocke plus, mais il

libère moins. Un clamp euglycémique, hyper-insulinémique, permettrait de savoir si la sensibilité à l'insuline est effectivement améliorée et de connaître plus précisément quels sont les tissus touchés.

Cet effet insulino-sécrétagogue du Ki16425 fait de cette molécule un composé pharmacologique qui pourrait être utilisé en thérapie (dans la catégorie des molécules augmentant la sécrétion d'insuline comme les sulfonyurées ou les glinides). Il serait tout de même intéressant de veiller à ce que cette légère augmentation de l'insulinémie à jeun n'induisse pas, à terme, de résistance à l'insuline. Dans cet article, nous avons présenté les données de l'insulinémie et des tests de tolérance (glucose et insuline) après 3 semaines de traitement quotidien, nous avons également poursuivi l'étude 7 semaines et l'insulinémie augmentée et toujours associée à une meilleure tolérance lors de ces tests (voir **protocole complémentaire 1**).

Par contre, en situation nourrie (**protocole complémentaire 2**) ou lors du test de tolérance au glucose, l'insulinémie des animaux traités au Ki16425 n'est pas plus forte. Lors du test de tolérance au glucose par exemple, l'augmentation de l'insulinémie en réponse au glucose est même plus faible chez les souris traitées au Ki16425, comparativement aux contrôles, ce qui reflète bien une meilleure sensibilité à l'insuline de ces souris.

Cette légère hyper-insulinémie peut être le signe d'une action protectrice du traitement sur les cellules β pancréatiques. En effet, il est bien établi que l'obésité conduit, après une phase de compensation, à la dégénérescence progressive des cellules bêta, ce qui participe à l'apparition de troubles de la production d'insuline associée à l'obésité [271]. L'analyse histologique du pancréas a révélé que le nombre d'îlots pancréatiques était plus élevé chez les souris traitées au Ki1625 par rapport aux souris contrôles. Il serait maintenant intéressant de savoir si cet effet résulte d'une prolifération des cellules β et d'une moindre apoptose. Ces données pourraient être obtenues par une étude BrdU et TUNNEL respectivement.

Au vu de ces données, et ayant un effet protecteur sur le pancréas, le Ki16425 représente une cible possible de traitement contre la gluco-intolérance et le diabète. Il serait maintenant intéressant de savoir comment le LPA agit. Dans cette étude nous avons regardé l'expression d'un gène particulièrement important pour le maintien et le développement des cellules β ,

PDX1. Nous n'observons aucune variation. Cependant, les analyses géniques ont été réalisées sur pancréas entier ; il serait plus approprié de connaître l'expression de ce gène au sein des îlots (qui ne représentent qu'une petite partie du pancréas). Ces données sont très encourageantes pour ce qui est de protéger, de régénérer, ou de remplacer les cellules β touchées par le diabète. Les données nouvelles sur la plasticité des cellules β pancréatiques humaines [356] ont éveillé de nouvelles perspectives thérapeutiques et le Ki16425 permettrait peut-être d'ouvrir des pistes nouvelles.

Hypertrophie adipocytaire et sensibilité à l'insuline

Dans nos études, bloquer la signalisation ATX/LPA induit une augmentation de la prise de masse grasse associée à une hypertrophie et de façon surprenante à une amélioration du statut métabolique. Le tissu adipeux se développe par hypertrophie et / ou hyperplasie [16] et la taille des adipocytes est d'une grande importance [243]. En effet, c'est l'hypertrophie qui serait à l'origine du développement des conséquences néfastes de l'obésité [16, 24]. Dans ce sens, différentes études ont montré que la résistance à l'insuline et le risque accru de développer un diabète de type 2 étaient corrélés avec la taille des adipocytes [232, 404]. En effet, les petits adipocytes sont plus sensibles à l'insuline et sont capables de stocker plus de graisse que les grands, limitant ainsi l'accumulation ectopique de lipides mais aussi la régulation des niveaux d'expression de cytokines inflammatoires telles que le TNF α . Quelques études défendent cependant nos résultats en montrant, comme nous, un effet sur l'adiposité associée à une hypertrophie adipocytaire et à une meilleure tolérance au glucose [198].

Effets du LPA en chronique

Il serait intéressant de déterminer si un lien existe entre les effets aigus du LPA et les effets du traitement chronique au Ki16425. En effet, nous avons montré que l'effet négatif du LPA sur la gluco-tolérance est transitoire. L'étude de l'administration chronique de LPA serait intéressante, pour voir si l'on obtient à la fois un effet négatif sur l'adipogenèse (partie résultats 1) et un impact négatif sur la tolérance au glucose plus durable. Lors de ma thèse, j'ai réalisé une première tentative de traitement chronique au LPA. Des données encourageantes sont apparues : perte de poids, diminution des gènes de l'adipogenèse dans les dépôts

adipeux ; mais ces données sont faussées par un effet du traitement sur la prise alimentaire. En effet, le LPA induit une diminution de la prise alimentaire. Pour ce traitement, nous avons utilisé la même dose que dans l'**article 2** (50mg/kg) pendant 7 jours. Cette dose semble-t-il n'a rien de physiologique puisque les souris diminuent leur prise alimentaire mais développent aussi de la fibrose au niveau des tissus du péritoine (données plus développées dans la partie résultats 3 : ATX/LPA et fibrose associée à l'obésité). Ce genre de protocole chronique devrait être reproduit mais avec des doses plus faibles de LPA, qui permettraient un effet plus modéré et un traitement plus long.

L'ensemble des 2 parties décrites précédemment est rassemblé et discuté dans une revue (**quatrième article** (voir annexes)).

III- Protocole complémentaire 2

Sur des souris de 12 semaines, nourries en régime normal, nous avons regardé l'effet d'une injection de LPA (50mg/kg - ip) ou de son véhicule sur la glycémie, l'insulinémie et les stocks hépatique de glycogène 120 min après l'injection. Les résultats obtenus sont illustrés ci-dessous.

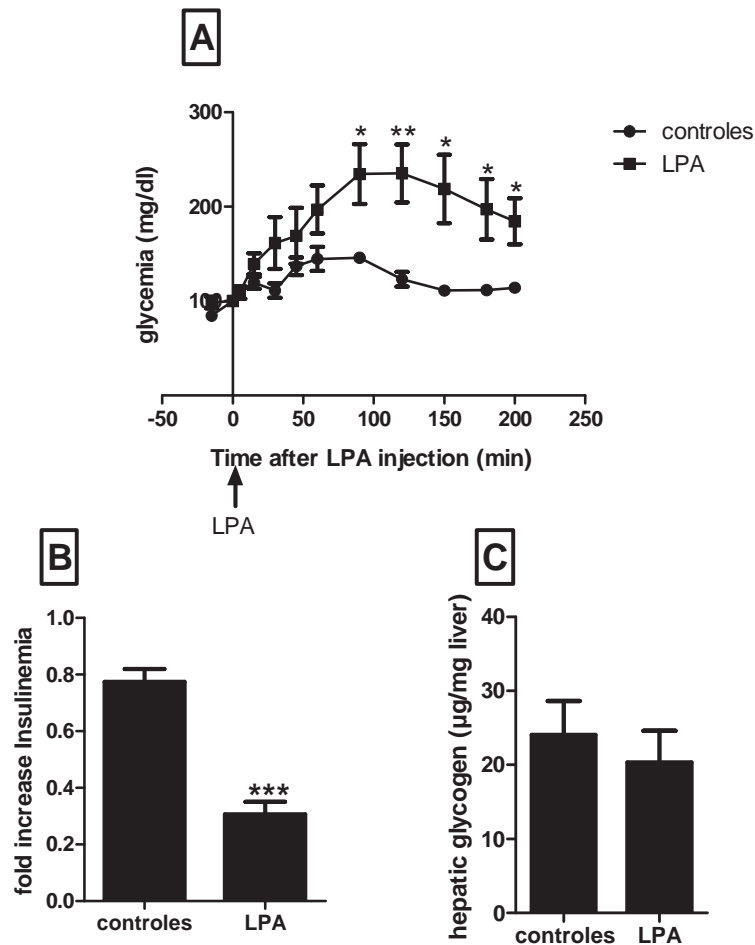


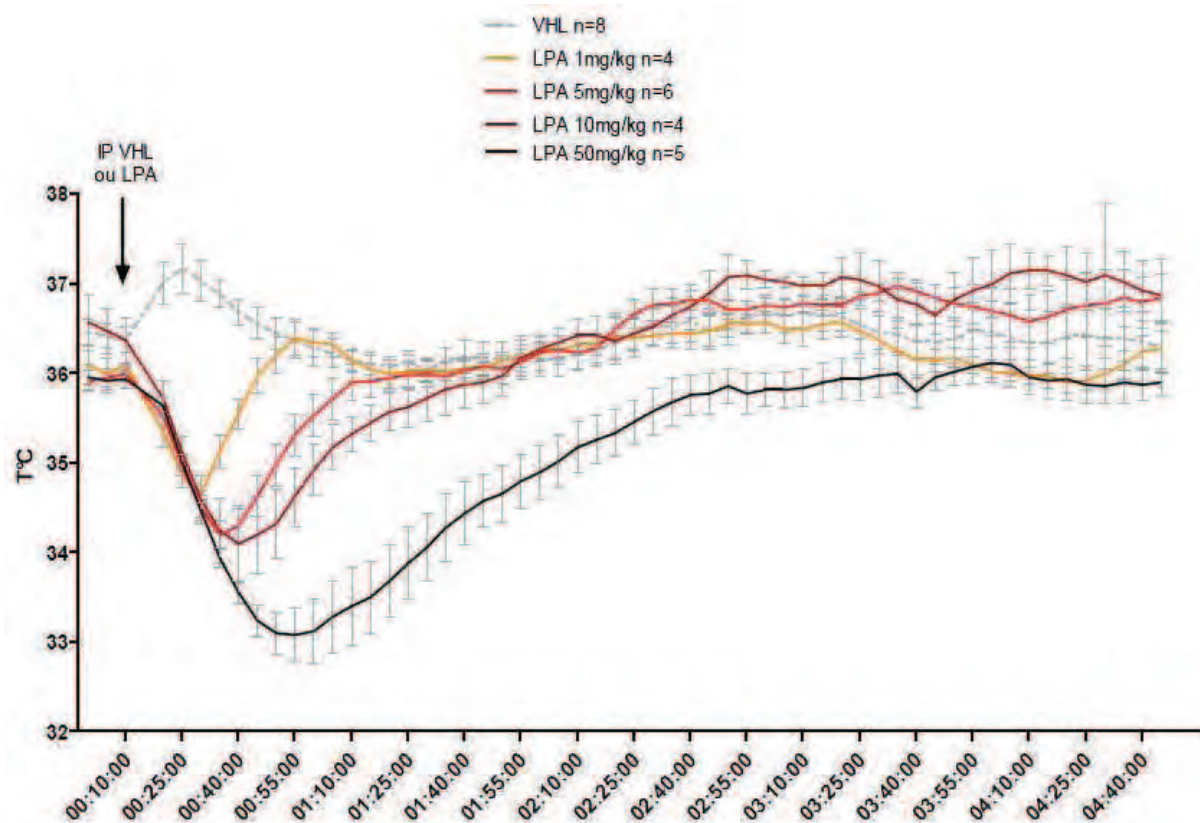
Figure : Effet d'une injection de LPA (50mg/kg - ip) sur la glycémie (A), l'insulinémie (en fois d'augmentation) 30 min après l'injection (B) et les taux de glycogène hépatique 120min après l'injection (C)
 n=5 par groupe t test ***p<0.001 et Anova *;p<0.05 **;p<0.01

Dans cette figure nous montrons qu'une injection ip de LPA induit une hyperglycémie, associée à une baisse de l'insulinémie, sans variations des taux de glycogènes hépatiques.

Ces résultats ont été discutés dans le paragraphe précédent.

IV- Protocole complémentaire 3

Sur des souris ND de 12 semaines, nous avons suivi, en télémétrie, après implantation de puces intra-péritonéales, la température après injection de différentes doses de LPA.



On observe un puissant effet dose/réponse hypothermiant du LPA lors d'une injection ip.

Résultats 3 : ATX/LPA et Fibrose associée à l'obésité

I- Contexte bibliographique et projet

Le LPA est connu comme un agent pro-fibrosant en agissant sur son récepteur 1 (LPA1), voir chapitre correspondant. Les effets pro-fibrosants du LPA ont été décrits au niveau du rein, des poumons, du foie, des artères, de la peau et du péritoine. Lors de ma thèse, j'ai fait dans un premier temps l'état des lieux des connaissances sur les effets pro-fibrosants du LPA et les molécules pharmacologiques qui les bloquent en ciblant le LPA1 (**Revue : quatrième article** (voir annexes)).

En situation d'obésité, les phénomènes de fibroses sont augmentés dans de nombreux tissus (foie, reins, cœur, vaisseaux, pancréas, muscles etc). La fibrose est un processus de cicatrisation mal contrôlée, qui conduit à l'accumulation excessive de matrice extracellulaire, conduisant à la perte de l'architecture du tissu et par conséquent à la perte de fonction du tissu. Les fibroses qui se développent en situation d'obésité participent à l'apparition de pathologies associées : cirrhose hépatique, néphropathies, cardiomyopathies, athérosclérose etc. Récemment, la fibrose du tissu adipeux a été mise en évidence (voir chapitre correspondant). L'effet pro-fibrosant du LPA au niveau du tissu adipeux n'a encore jamais été mis en évidence. C'est l'un des objectifs de ma thèse.

Au sein du tissu adipeux, l'augmentation de l'expression de l'ATX suggère que la production augmentée de LPA puisse agir, de façon paracrine, sur la mise en place de la fibrose du tissu adipeux qui apparaît lors de l'obésité. Ce dernier axe d'étude a permis l'élaboration d'un manuscrit, **cinquième article**. Pour cela, nous avons travaillé sur un autre modèle d'obésité, les souris *db/db*, qui développent plus rapidement la fibrose, comparativement au modèle nutritionnel utilisé précédemment. En se calquant sur les protocoles précédents, nous avons traité ces animaux avec l'antagoniste des récepteurs LPA1/3 (Ki16425) en chronique. Ce traitement induit chez la souris, comme chez les 2 précédents modèles (protocole F-ATX KO sous HFD et protocole traitement Ki16425 sous HFD), une amélioration de la tolérance à l'insuline. Notre molécule pharmacologique est donc efficace, même chez un modèle d'obésité avancée associée à un diabète qu'est la souris *db/db*.

Nous avons suivi l'impact de ce traitement sur les marqueurs de fibrose du tissu adipeux.

En parallèle, nous avons testé les effets pro-fibrosants du LPA directement sur des explants de tissu adipeux humain.

II- Article 5

Pro-fibrotic activity of Lysophosphatidic acid in Adipose tissue: *in vivo* and *in vitro* evidence

Rancoule C, Gres S, Viaud M, Bascands JL, Valet P, Saulnier-Blache JS

Article accepté dans BBA-Molecular and cell biology of lipids le 02 Octobre 2013

(la version journal n'a pas pu être ajoutée au manuscrit de thèse)

Pro-fibrotic activity of Lysophosphatidic acid in Adipose tissue: *in vivo* and *in vitro* evidence

Chloé Rancoule^{a,b}, Manon Viaud^{a,b}, Sandra Gres^{a,b}, Nathalie Viguerie^{a,b},
Pauline Decaunes^{a,b}, Anne Bouloumié^{a,b}, Dominique Langin^{a,b,c}, Jean-Loup
Bascands^{a,b}, Philippe Valet^{a,b}, Jean Sébastien Saulnier-Blache^{a,b,*}

^aInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM),
UMR1048, Toulouse, Cedex 4, France

^bUniversité de Toulouse, Université Paul Sabatier, Institut des Maladies
Métaboliques et Cardiovasculaires, BP84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France

^cCentre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Service de Biochimie, Institut
Fédératif de Biologie, Toulouse, France

*Corresponding author:

Jean Sébastien Saulnier-Blache,

Email: Jean-Sebastien.Saulnier-Blache@inserm.fr

tel: (33) 561325636, fax: (33) 562325623

Key words: Lysophosphatidic acid, adipose tissue, fibrosis

23

24 **ABSTRACT**

25

26 Lysophosphatidic acid (LPA) is a pro-fibrotic mediator acting via specific
27 receptors (LPARs) and is synthesized by autotaxin, which expression is increased in
28 obesity. We tested whether LPA could play a role in adipose tissue (AT)-fibrosis
29 associated with obesity. Fibrosis [type I, III, and IV collagens (COL), fibronectin (FN),
30 TGF β , CTGF and α SMA] and inflammation (MCP1 and F4/80) markers were
31 quantified: (i) *in vivo* in inguinal (IAT) and perigonadic (PGAT) AT from obese-
32 diabetic db/db mice treated with the LPAR antagonist Ki16425 (5 mg/kg/day ip for 7
33 weeks); and (ii) *in vitro* in human AT explants in primary culture for 72h in the
34 presence of oleoyl-LPA (10 μ M) and/or Ki16425 (10 μ M) and/or the HIF-1 α inhibitor
35 YC-1 (100 μ M). Treatment of db/db mice with Ki16425 reduced COL I and IV mRNAs
36 in IAT and PGAT while COL III mRNAs were only reduced in IAT. This was
37 associated with reduction of COL protein staining in both IAT and PGAT. AT explants
38 showed a spontaneous and time-dependent increase in ATX expression and
39 production of LPA in the culture medium, along with increased levels of COL I and III,
40 TGF β and α SMA mRNAs and of COL protein staining. *In vitro* fibrosis was blocked
41 by Ki16425 and was further amplified by oleoyl-LPA. LPA-dependent *in vitro* fibrosis
42 was blocked by co-treatment with YC1. Our results show that endogenous and
43 exogenous LPA exert a pro-fibrotic activity in AT *in vivo* and *in vitro*. This activity
44 could be mediated by an LPA1R-dependent pathway and could involve HIF-1 α .

45

46

INTRODUCTION

During obesity, excessive fat accumulation is characterized by major structural changes of the adipose tissue (AT). Beside hypertrophy and hyperplasia of adipocytes and infiltration of inflammatory cells, AT from obese individuals displays excessive deposition of extracellular matrix, mainly collagens [1]. In human, AT fibrosis is positively correlated with body mass index and with the size of the adipocytes, and inflammation, and is inversely correlated with insulin-sensitivity [2-5]. Association between obesity and AT fibrosis has also been established in mouse [6-8]. AT fibrosis has been associated to inflammation [9, 10], to hypoxia and to transcription factor HIF-1 (hypoxia inducing factor-1) [11-14].

Lysophosphatidic acid (LPA) is a phospholipid mediator acting through specific G-protein coupled receptors (LPA1R to LPA6R) [15]. LPA is synthesized in the extracellular medium of AT by a secreted lysophospholipase D, (autotaxin (ATX)) [16-20]. ATX expression is increased in high fat diet-fed obese mice [20] and in genetically obese/diabetic db/db mice [18, 21]. In human, ATX expression is up-regulated in massively obese patients with diabetes or impaired glucose tolerance when compared to massively obese patients with normal glucose homeostasis [21, 22]. Recently we demonstrated that LPA exerts a deleterious effect on glucose-tolerance by inhibiting insulin-secretion [23]. The LPA1R is the most abundant LPAR subtype present in AT, but its expression is poorly affected by obesity [22]. Available pharmacologic tools to target LPARs are still scarce [24], but one of them, Ki16425 [25] has already demonstrated its *in vivo* antagonist LPAR efficacy [23, 26, 27].

LPA has been demonstrated as a pro-fibrotic mediator in various organs such as kidney [27], lung [28], liver [29], peritoneum [30], skin [31], retina [32] and heart [33]. The pro-fibrotic action of LPA is mainly mediated by LPA1R [34]. The pro-fibrotic activity of LPA is dependent on several intracellular targets including G α 12/13 or G α q-dependent activation of Rho/Rho-kinase [35, 36], the mTOR-dependent activation of PKC [37], the upregulation of the pro-fibrotic factor CTGF [38] and an integrin-dependent transactivation of TGF β [39]. To our knowledge, the involvement of LPA in AT fibrosis has never been explored.

Here we show for the first time that endogenous and exogenous LPA exert a pro-fibrotic action in AT fibrosis *in vivo* and *in vitro*. This activity could be mediated by an LPA1R-dependent pathway and may involve HIF-1 α .

METHODS

Mice and *in vivo* treatments. Analysis and treatments were conducted on 6 week-old C57BLKSJ heterozygous lean db/m and homozygous obese db/db male mice. Mice were fed daily with a standard rodent chow [energy (kcal) contents of 16% protein, 81% carbohydrate and 3% fat (SAFE, Augy, France)] and were housed conventionally under a constant temperature (20-22°C) and humidity (50-60%) with a 12/12h light/dark cycle (lights on at 7:00 am) and free access to food and water. Animals were handled in accordance with the principles and guidelines established by the National Institute of Medical Research (INSERM) and were in conformity with the 'Principles of laboratory animal care' (NIH publication no. 85-23, revised 1985 <http://grants1.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.htm>). Protocols were approved by the animal ethic committee of the Regional Center of Functional Exploration and Experimental Resources (UMS06, Toulouse, France): agreement #12/1048/03/15. Ki16425 (Cayman Chemicals) was diluted at the concentration of 1 mg/ml in PBS supplemented with 10% DMSO. Ki16425 (5 mg/kg) and vehicle (control) were administrated by daily intraperitoneal (ip) injection as previously described [23] for 7 weeks. We previously demonstrated that chronic treatment with Ki16425 (5 mg/kg/day) improved insulin tolerance of high-fat diet obese mice through a blockade of the deleterious effect of LPA on glucose homeostasis [23, 40]. To determine whether Ki16425 was efficient in db/db mice, insulin tolerance tests were conducted one week before sacrifice, as previously described [23]. As shown in Table 2, Ki16425-treated db/db mice showed a significant improvement in insulin tolerance when compared to control as revealed by the significant decreased AUC. Ki16425 treatment also led to a significant reduction in fasting insulinemia while glycemia and glycated hemoglobin remained unchanged. As also shown in Table 2, Ki16425-treatment did not significantly influence body weight, and the weight of IAT, PGAT and liver. Plasma and organs were collected for biochemical and histological analysis and for mRNA quantification. Blood glucose was quantified using a glucose meter (Accu-check, Roche Diagnostic, Grenoble, France). Plasma insulin was quantified using a mouse insulin Elisa kit (Mercodia, Uppsala, Sweden).

Histological analysis. Immediately after dissection, a piece of AT was fixed in formalin 4% for 24 h, and kept at 4°C in 70% ethanol until embedding in paraffin and sectioning (5µm-thick). Sections were stained for collagens by using 0.1% sirius red in water saturated picric acid. Red staining pixels of 20 microscope fields were quantified with using LuciaG (Laboratory Imaging, Praha, Czech Republic).

Culture and treatments of human adipose tissue explants. Human subcutaneous adipose tissue samples were collected from patients who underwent abdominal dermo- lipectomy during restorative surgery. The protocol was performed according to Declaration of Helsinki and to the guidelines of the Ethical Committee of Rangueil Hospital of Toulouse. Adipose tissue explants were prepared as previously described [17, 41] with fews modifications. Adipose tissue was carefully dissected out from skin and vessels and cut in small explants (average weight 40-50 mg) under sterile conditions. Explants (500-700 mg) were placed in 6 well plates in 2ml DMEM/F12 medium supplemented with 2% of fatty acid-free bovine serum albumin (BSA). AT explants were maintained in culture from 0 to 72h in the absence or the presence of 10 µM Ki16425 (Cayman Chemicals) or 10 µM oleoyl-LPA (Avanti Polar, Alabaster, USA) or 100 µM of the HIF-1a inhibitor, YC-1 5-(1-(phenylmethyl)-1H-indazol-3-yl)-2-furanmethanol) [42, 43] or combined co-treatments. At the end of incubation, the culture media was collected to quantify LPA, and RNA were extracted from AT explants for mRNA quantification. In separate experiments mRNAs were quantified from stroma-vascular (SVF) cells and adipocytes separated from adipose tissue explants. For that, AT explants were digested with liberase (TM Research Grad, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) at the final concentration of 0.008 Winsch unit/mL in DMEM/F12-BSA. After washing and filtration through a 150 µm mesh nylon, floating adipocytes and pelleted SV cells were separated by 10 min centrifugation at 100 rpm and RNA were extracted.

LPA quantification. LPA concentration was measured using a radioenzymatic assay as previously described [20, 44]. Briefly, lipids were extracted from AT conditioned media with an equal volume of 1-butanol and evaporated. Extracted lipids were converted into [¹⁴C]phosphatidic acid with recombinant LPA acyl-

transferase in the presence of [¹⁴C]oleoyl-CoA. The products of the reaction were extracted, separated by one-dimensional TLC and autoradiographed.

mRNA quantification. Total RNAs were extracted from tissues and cells using the RNeasy mini kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany). Total RNA (500 ng) was reverse transcribed for 60 min at 37°C using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, St Aubin, France) in the presence of random hexamers. A minus RT reaction was performed in parallel to ensure the absence of genomic DNA contamination. Real-time PCR was performed on 12.5 ng cDNA and 100 to 900 nmol/l specific oligonucleotide primers in a final volume of 20 µl using the Mesa blue QPCR Master Mix for Sybr (Eurogentec, Angers, France). Fluorescence was monitored and analyzed in a StepOnePlus Real-Time PCR system instrument (Applied Biosystems, St Aubin, France). Reference genes were β-actin and LRP10 in mice and human respectively. Normalization of gene expression according to the following formula $2^{-(Ct_{ref}-Ct_{gene})}$ where Ct corresponds to the number of cycles needed to generate a fluorescent signal above a predefined threshold. Oligonucleotide primers were designed using the Primer Express software (Applied Biosystems, St Aubin, France). The sequence of mouse- and human-specific oligonucleotide primers is listed in Table S1 and S2.

Statistics. Data are presented as means ± SEM. Bilateral Student's t-test was used to compare two groups of data. A two-way ANOVA was applied to detect interaction between treatment and time. *: P<0.05; **: P<0.01; ***: P<0.001.

RESULTS

1/ Db/db mice display fibrosis and up-regulation of ATX.

Fibrosis and inflammation have been reported in AT and liver from obese/diabetic db/db mice [6, 7, 45, 46]. Indeed, when compared to control non-obese db/m, db/db mice indeed displayed higher levels of type I, III and IV collagens (Col) and fibronectin (Fn) mRNAs in inguinal (IAT) and perigonadal (PGAT) AT, and in the liver (Table 1). These changes were associated with higher levels of the pro-fibrotic cytokines TGFβ and CTGF and of the myofibroblast marker αSMA in IAT and

the liver, but not in PGAT (Table 1). Moreover, expression of inflammation markers (F4/80 and MCP1) was increased in IAT, PGAT and in the liver (Table 1). We previously reported that the LPA-producing enzyme ATX is overexpressed in adipocytes from db/db mice [21]. In the present study, ATX mRNA level was indeed significantly increased in IAT from db/db when compared to db/m mice (Table 1). A trend towards an increase was also observed in PGAT but was not significant (Table 1). Moreover, increased expression of ATX was also observed in the liver of db/db when compared to db/m mice (Table 1). These data confirm that AT and the liver from obese/diabetic db/db mice display fibrosis, inflammation, and up-regulation of ATX.

2/ Blockade of LPARs attenuates AT fibrosis in db/db mice.

To test whether LPA could play a role in AT fibrosis of db/db mice, a 7 weeks treatment with the LPA1/LPA3R antagonist Ki16425 was performed [25]. After having validated the *in vivo* antagonist efficiency of Ki16425 in db/db mice (see Methods and Table 2), we analyzed its influence on AT fibrosis. When compared to control, Ki16425-treated db/db mice showed a significant reduction in Col I and Col IV mRNA levels in IAT (Figure 1A) and PGAT (Figure 1B). A significant reduction in Col III mRNA was also observed in IAT (Figure 1A) but not in PGAT (Figure 1B). In IAT and PGAT, down-regulation of Col mRNAs was associated with a significant reduction in interstitial COL protein content (Sirius red staining) (Figure 1C and Figure S1). In the liver, no significant change in Col I, Col III and Col IV mRNA was observed (Figures 1D). These results show that, in db/db mice, pharmacological blockade of LPA-receptors reduces fibrosis in AT but not in the liver. We thus propose that LPA exerts a tonic pro-fibrotic action in AT from db/db mice.

In AT, Ki16425-mediated down-regulation of collagens was associated with an increase in the metalloproteinase MMP9 but not in MMP1 mRNAs, and a down-regulation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) mRNAs (Figure 1A and B). In contrast, no change in FN, TGF β , CTGF, α SMA mRNAs (Figure 1A and B) was observed. These results suggest that the pro-fibrotic action of LPA is associated with an imbalance between synthesis and degradation of collagens. Ki16425-treatment had no influence on the expression of the inflammation markers MCP1 and F4/80 (Figure 1A and B). Intriguingly, Ki16425-treatment led to a slight increase of TNF α

mRNAs when compared to control ($1.9 \pm 0.3^*$ and $1.5 \pm 0.1^*$ in IAT and PGAT respectively). These observations suggested that LPA does not increase AT inflammation.

Since Ki16425 is a mixed LPA1/3R antagonist [25], we analyzed the expression of LPA1R and LPA3R in IAT, PGAT and the liver from db/db mice. In the three tissues, LPA1R mRNAs largely predominated over LPA3R and the other LPAR subtype mRNAs (Table 1). This suggests that the pro-fibrotic action of LPA in AT is mainly mediated through an LPA1R-dependent pathway. Moreover, as shown in Table 1, LPA1R mRNA level was more than 2 fold higher in AT than in liver. This suggests that, in db/db mice, AT is more sensitive to LPA than the liver, and might explain why the protective effect of Ki16425 against fibrosis was restricted to AT.

3/ *In vitro* pro-fibrotic action of endogenous and exogenous LPA in AT.

The *in vivo* results suggest that LPA is involved in development of fibrosis in AT in obese mice. To determine whether LPA could exert a direct pro-fibrotic action on AT, *in vitro* experiments were conducted in human AT explants in primary culture [17, 41]. In agreement with previous reports [21, 22], ATX mRNAs was present in our human AT samples with a higher expression in adipocytes than in SVF, (Figure S2B). LPARs mRNAs were also present, LPA1R being more expressed than LPA3R (Figure S2A). Moreover, LPA1R expression was higher in SVF than in adipocytes (Figure S2B). Observations were similar for Col I, COL III, TGF β and α SMA mRNAs (Figure S2B). These results are in agreement with previous reports [3, 4, 47] and show that in AT, both LPA sensitivity and fibrosis mainly occurs through targeting of the SVF.

To precise which cell type(s) is the preferential target of LPA in SVF, LPA1R expression was determined from previously published DNA microarrays analysis of SVF-cell subpopulations and isolated adipocytes [48]. As shown in Figure S3, LPA1R expression in progenitor cells was higher than in macrophages and adipocytes (3.9 and 16 fold respectively). These results suggest that the progenitor subpopulation of SVF is the main target of the pro-fibrotic activity LPA. That conclusion is in agreement with previous reports showing that, in addition to adipogenic and angiogenic potentials [49, 50] the progenitor cell subpopulation exhibits myofibroblast potential as a major determinant of fibrosis in adipose tissue [51].

In the absence of treatment, human AT in primary culture showed a spontaneous and time-dependent increase in the level of ATX (Figure 2A). This was accompanied by a transient increase in the LPA concentration in the culture medium with a maximum after 48h of culture (Figure 2B). Increased expression of ATX, was also accompanied by increased expression of Col I and III mRNAs (Figure 2C) and collagen protein content (Figure 2D and Figure S3). Up-regulation of collagens was accompanied by up-regulation of TGF β and α SMA (Figure 2E), but not of Fn (Figure 2F) and LPA1R mRNAs (Figure 2A). These results show that maintaining AT explants in primary culture was sufficient to induce both LPA production and expression of fibrosis associated genes.

To test whether endogenous production of LPA by AT explants could be responsible for *in vitro* fibrosis, explants were cultured in the presence of Ki16425 alone (10 μ M). After 72h of culture, Ki16425 significantly attenuated Col I and III mRNA levels when compared to control (Figure 3A and B). Similar results were obtained with TGF β , and α SMA (Figure 3C and D). These results suggest that endogenous LPA exerts a tonic pro-fibrotic action on AT through an LPAR-dependent mechanism.

To determine whether exogenous LPA could trigger a direct profibrotic action in AT, explants were cultured in the presence of oleoyl-LPA (10 μ M). After 72h of culture, oleoyl-LPA significantly amplified the spontaneous increase Col III mRNAs (Figure 3B). A trend towards amplification of Col I was also observed but was not significant (Figure 3A). Moreover, oleoyl-LPA also significantly amplified the spontaneous increase of TGF β (Figure 3C), and α SMA (Figure 3D) but not of Fn mRNAs (Figure 3E). The amplifying effect of oleoyl-LPA on Col I, Col III, TGF β and α SMA was not observed after co-treatment with 10 μ M Ki16425 (Figure 3A to D). These results show that exogenous LPA was able to exert a direct pro-fibrotic action in human AT through a LPAR-dependent mechanism.

4/ Involvement of HIF-1 α in LPA-induced fibrosis.

Hypoxia induced factor-1 α (HIF-1 α) has previously been involved in AT fibrosis [11, 14]. Moreover, LPA was reported to activate HIF-1 α [52-54], but this has not been shown in AT. Hence, we verified whether HIF-1 α is involved in LPA-mediated fibrosis in human AT. We first observed, after 72h treatment of AT explants with 10

μM oleoyl-LPA, that HIF-1α mRNA expression was significantly increased when compared to controls (Figure 4A). The canonical HIF-1α-dependent gene VEGF displayed similar up-regulation upon oleoyl-LPA treatment (Figure 4A). Co-treatment with 10 μM Ki16425 inhibited up-regulation of HIF-1a and VEGF by oleoyl-LPA (Figure 4A). In addition, up-regulation of VEGF mRNA expression by oleoyl-LPA was attenuated after co-treatment with 100 μM of the HIF-1α inhibitor, YC-1 [43] (Figure 4B). Finally, after YC-1 co-treatment, up-regulation of COL I, III and αSMA mRNAs but not TGF mRNAs by oleoyl-LPA were not observed (Figure 4C). These results show that oleoyl-LPA activates HIF-1α-dependent pathways that could be responsible for the pro-fibrotic activity of LPA in AT.

To determine whether LPA-dependent regulation of fibrosis mRNA markers was associated with changes in interstitial collagen content, histological analysis were performed in AT explants. After 72h treatment with 10 μM oleoyl-LPA, sirius red staining was significantly increased when compare to control (Figure 4C and Figure S4). Moreover, co-treatment with 100 μM YC-1, significantly suppressed the LPA-dependent increase in collagen content (Figure 4C and Figure S4). These results demonstrate that HIF-dependent pro-fibrotic activity of LPA-dependent in AT also occurs at the protein level.

DISCUSSION

In normal conditions ECM network constitutes a mechanical support for the adipocytes that ensure adipose tissue cohesion. In both human and animal models fibrosis of the AT has been associated with obesity, and insulin-resistance [1]. Although not clearly established, it is likely that, as also shown for other organs such as liver or kidney, fibrosis could alter AT development and function. During obesity, rapid expansion of adipose tissue is necessary to buffer excess energy supply. Altering AT expandability might therefore lead to ectopic lipid deposition in other peripheral organs such as liver or muscle and alter the overall metabolic homeostasis of the organism. One of the consequences of AT fibrosis would be to mechanically constrain adipocyte expansion and thus reduce its buffering capacity of caloric overload. Excessive ECM accumulation might also exert a negative influence on adipogenesis and insulin-sensitivity, two crucial events for adipose tissue expansion

[55]. It is therefore crucial to uncover the determinant factors involved in AT fibrosis with the aim to identify new targets for the treatment of obesity-associated diseases.

In the present study, we present evidence for an involvement of LPA in the development of fibrosis in AT. Both endogenous and exogenous LPA are able to up-regulate collagen expression in AT at mRNA and protein levels and this is associated with up-regulation of other fibrosis gene markers such as TGF β and α SMA. The pro-fibrotic activity of LPA in AT is in line with previously reported data in other organs such as the kidney [27], lung [28], skin [31, 56], retina [32], peritoneum [30] and heart [33].

Our results show that, the anti-fibrotic activity of the antagonist Ki16424 is not associated with a change in the expression of inflammatory markers in AT of db/db mice. This suggests that alteration of inflammation is not a prerequisite for the pro-fibrotic activity of LPA in AT. Yet, fibrosis is generally considered to be tightly associated with and consecutive to inflammation [57], including in AT [9], although other studies challenge the contribution of inflammation in fibrosis [10]. Our results do not resolve that debate but at least suggest that the pro-fibrotic action of LPA can be dissociated from inflammation.

We show that the pro-fibrotic activity of LPA in AT is blocked by Ki16425 *in vitro* and *in vivo*. Ki16425 is a mixed antagonist for LPA1R and LPA3R with close affinity for the two subtypes [25]. Our results show that, in AT, LPA1R is predominant over LPA3R. This suggests that, although LPA3R cannot completely be ruled out, the pro-fibrotic activity of LPA in AT is likely mediated mainly through LPA1R. Pharmacologic and transgenic approaches led to the same conclusion regarding the pro-fibrotic activity of LPA in other organs [27, 28, 30, 31, 58, 59, 60, 61].

Conversely to AT, Ki16425 had no impact on liver fibrosis, despite the presence of the LPA-synthesizing enzyme ATX in this organ. In parallel, we found that LPA1R is more abundant in AT than in liver suggesting that liver is less sensitive to LPA than AT. This might explain the absence of impact of Ki16425 in liver fibrosis. Increased LPA production has been reported in liver fibrosis [29, 62, 63, 64, 65, 66] but its involvement in liver fibrosis has not yet been clearly established. One cannot exclude the existence of LPAR subtypes other than LPA1R and LPA3R that might mediate a pro-fibrotic action of LPA in liver.

We show that the pro-fibrotic activity of LPA is blocked by co-treatment with the HIF-1 α inhibitor, YC-1 [43]. Such result suggests that HIF-1 α might be involved in the pro-fibrotic action of LPA. We are aware that, besides its HIF-inhibitory action, YC-1 is also described as an activator of guanylate cyclase (GC) [67]. Thus, a possible involvement of GC and NO in the pro-fibrotic activity of LPA cannot be excluded. Nevertheless, our results show that LPA increases the expression of the canonical HIF-1 α target gene, VEGF, and this activation is blocked by YC-1. This observation is in agreement with previous reports showing the ability of LPA to activate HIF-1 α activity in ovarian cancer cells [52, 53, 54, 68], carotid [69] and in foetal brain [70]. We therefore propose that, although not exclusive, HIF-1 α likely plays an important role in the pro-fibrotic action LPA in AT.

In conclusion, the present work provides evidence both in vitro and in vivo for an important contribution of LPA in the aetiology of AT fibrosis. Because of the possible involvement of AT fibrosis in insulin-resistance, ATX and LPA1R, represent potential interesting pharmacological targets to prevent and/or to treat metabolic defects associated with obesity.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Joost Schanstra (INSERM 1048, Toulouse, France) for fruitful discussions and reviewing of the manuscript. We also thank Florence Capilla and Sophie Legonidec (INSERM US06 CREFRE, Toulouse, France) for their very helpful technical assistance. Chloé Rancoule is supported by a grant from University Paul Sabatier (Toulouse, France). This work was supported by grants from INSERM, the “Fondation pour la Recherche Médicale” (grant #DRM20101220459), the Région Midi Pyrénées, and the Commission of the European Communities (Project ADAPT # HEALTH-F2-2008-2011 00). All authors participated in the conception and design, or analysis and interpretation of the data, contributed to drafting and revising the manuscript, and gave final approval of the version to be published.

Supplementary information is available at the journal's website

375 **REFERENCES**

- 376 [1] E.C. Mariman, P. Wang, Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and
377 role in obesity, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67 (2010) 1277-1292.
- 378 [2] C.S. Tam, J. Tordjman, A. Divoux, L.A. Baur, K. Clement, Adipose tissue remodeling in
379 children: the link between collagen deposition and age-related adipocyte growth, *The*
380 *Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 97 (2012) 1320-1327.
- 381 [3] M. Spencer, A. Yao-Borengasser, R. Unal, N. Rasouli, C.M. Gurley, B. Zhu, C.A. Peterson,
382 P.A. Kern, Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with
383 collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation, *American journal of*
384 *physiology. Endocrinology and metabolism*, 299 (2010) E1016-1027.
- 385 [4] A. Divoux, J. Tordjman, D. Lacasa, N. Veyrie, D. Hugol, A. Aissat, A. Basdevant, M.
386 Guerre-Millo, C. Poitou, J.D. Zucker, P. Bedossa, K. Clement, Fibrosis in human adipose
387 tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss,
388 *Diabetes*, 59 (2010) 2817-2825.
- 389 [5] M. Pasarica, B. Gowronska-Kozak, D. Burk, I. Remedios, D. Hymel, J. Gimble, E.
390 Ravussin, G.A. Bray, S.R. Smith, Adipose tissue collagen VI in obesity, *The Journal of*
391 *clinical endocrinology and metabolism*, 94 (2009) 5155-5162.
- 392 [6] T. Khan, E.S. Muise, P. Iyengar, Z.V. Wang, M. Chandalia, N. Abate, B.B. Zhang, P.
393 Bonaldo, S. Chua, P.E. Scherer, Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role
394 of collagen VI, *Molecular and cellular biology*, 29 (2009) 1575-1591.
- 395 [7] J. Huber, M. Loffler, M. Bilban, M. Reimers, A. Kadl, J. Todoric, M. Zeyda, R. Geyeregger,
396 M. Schreiner, T. Weichhart, N. Leitinger, W. Waldhausl, T.M. Stulnig, Prevention of high-
397 fat diet-induced adipose tissue remodeling in obese diabetic mice by n-3
398 polyunsaturated fatty acids, *International journal of obesity*, 31 (2007) 1004-1013.
- 399 [8] H.R. Lijnen, E. Maquoi, P. Holvoet, A. Mertens, F. Lupu, P. Morange, M.C. Alessi, I.
400 Juhan-Vague, Adipose tissue expression of gelatinases in mouse models of obesity,
401 *Thrombosis and haemostasis*, 85 (2001) 1111-1116.
- 402 [9] M. Keophiphath, V. Achard, C. Henegar, C. Rouault, K. Clement, D. Lacasa,
403 Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes,
404 *Molecular endocrinology*, 23 (2009) 11-24.
- 405 [10] V.J. Adapala, S.A. Adedokun, R.V. Considine, K.M. Ajuwon, Acute inflammation plays
406 a limited role in the regulation of adipose tissue COL1A1 protein abundance, *The Journal*
407 *of nutritional biochemistry*, 23 (2012) 567-572.
- 408 [11] N. Halberg, T. Khan, M.E. Trujillo, I. Wernstedt-Asterholm, A.D. Attie, S. Sherwani,
409 Z.V. Wang, S. Landskroner-Eiger, S. Dineen, U.J. Magalang, R.A. Brekken, P.E. Scherer,
410 Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose
411 tissue, *Molecular and cellular biology*, 29 (2009) 4467-4483.
- 412 [12] K.Y. Lee, S. Gesta, J. Boucher, X.L. Wang, C.R. Kahn, The differential role of
413 Hif1beta/Arnt and the hypoxic response in adipose function, fibrosis, and inflammation,
414 *Cell metabolism*, 14 (2011) 491-503.
- 415 [13] C. Jiang, A. Qu, T. Matsubara, T. Chanturiya, W. Jou, O. Gavrilova, Y.M. Shah, F.J.
416 Gonzalez, Disruption of hypoxia-inducible factor 1 in adipocytes improves insulin
417 sensitivity and decreases adiposity in high-fat diet-fed mice, *Diabetes*, 60 (2011) 2484-
418 2495.
- 419 [14] K. Sun, N. Halberg, M. Khan, U.J. Magalang, P.E. Scherer, Selective inhibition of
420 hypoxia-inducible factor 1alpha ameliorates adipose tissue dysfunction, *Molecular and*
421 *cellular biology*, 33 (2013) 904-917.

- [15] T. Mutoh, R. Rivera, J. Chun, Insights into the pharmacological relevance of lysophospholipid receptors, *British journal of pharmacology*, 165 (2012) 829-844.
- [16] P. Valet, C. Pages, O. Jeanneton, D. Daviaud, P. Barbe, M. Record, J.S. Saulnier-Blache, M. Lafontan, Alpha2-adrenergic receptor-mediated release of lysophosphatidic acid by adipocytes. A paracrine signal for preadipocyte growth, *The Journal of clinical investigation*, 101 (1998) 1431-1438.
- [17] S. Gesta, M.F. Simon, A. Rey, D. Sibrac, A. Girard, M. Lafontan, P. Valet, J.S. Saulnier-Blache, Secretion of a lysophospholipase D activity by adipocytes: involvement in lysophosphatidic acid synthesis, *Journal of lipid research*, 43 (2002) 904-910.
- [18] G. Ferry, E. Tellier, A. Try, S. Gres, I. Naime, M.F. Simon, M. Rodriguez, J. Boucher, I. Tack, S. Gesta, P. Chomar, M. Dieu, M. Raes, J.P. Galizzi, P. Valet, J.A. Boutin, J.S. Saulnier-Blache, Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity, *The Journal of biological chemistry*, 278 (2003) 18162-18169.
- [19] J.P. Pradere, E. Tarnus, S. Gres, P. Valet, J.S. Saulnier-Blache, Secretion and lysophospholipase D activity of autotaxin by adipocytes are controlled by N-glycosylation and signal peptidase, *Biochimica et biophysica acta*, 1771 (2007) 93-102.
- [20] R. Dusaulcy, C. Rancoule, S. Gres, E. Wanecq, A. Colom, C. Guigne, L.A. van Meeteren, W.H. Moolenaar, P. Valet, J.S. Saulnier-Blache, Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid, *Journal of lipid research*, 52 (2011) 1247-1255.
- [21] J. Boucher, D. Quilliot, J.P. Praderes, M.F. Simon, S. Gres, C. Guigne, D. Prevot, G. Ferry, J.A. Boutin, C. Carpenne, P. Valet, J.S. Saulnier-Blache, Potential involvement of adipocyte insulin resistance in obesity-associated up-regulation of adipocyte lysophospholipase D/autotaxin expression, *Diabetologia*, 48 (2005) 569-577.
- [22] C. Rancoule, R. Dusaulcy, K. Treguer, S. Gres, C. Guigne, D. Quilliot, P. Valet, J.S. Saulnier-Blache, Depot-specific regulation of autotaxin with obesity in human adipose tissue, *Journal of physiology and biochemistry*, 68 (2012) 635-644.
- [23] C. Rancoule, C. Attane, S. Gres, A. Fournel, R. Dusaulcy, C. Bertrand, C. Vinel, K. Treguer, M. Prentki, P. Valet, J.S. Saulnier-Blache, Lysophosphatidic acid impairs glucose homeostasis and inhibits insulin secretion in high-fat diet obese mice, *Diabetologia*, (2013).
- [24] K. Kano, N. Arima, M. Ohgami, J. Aoki, LPA and its analogs-attractive tools for elucidation of LPA biology and drug development, *Current medicinal chemistry*, 15 (2008) 2122-2131.
- [25] H. Ohta, K. Sato, N. Murata, A. Damirin, E. Malchinkhuu, J. Kon, T. Kimura, M. Tobo, Y. Yamazaki, T. Watanabe, M. Yagi, M. Sato, R. Suzuki, H. Murooka, T. Sakai, T. Nishitoba, D.S. Im, H. Nochi, K. Tamoto, H. Tomura, F. Okajima, Ki16425, a subtype-selective antagonist for EDG-family lysophosphatidic acid receptors, *Molecular pharmacology*, 64 (2003) 994-1005.
- [26] A. Boucharaba, C.M. Serre, J. Guglielmi, J.C. Bordet, P. Clezardin, O. Peyruchaud, The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (2006) 9643-9648.
- [27] J.P. Pradere, J. Klein, S. Gres, C. Guigne, E. Neau, P. Valet, D. Calise, J. Chun, J.L. Bascands, J.S. Saulnier-Blache, J.P. Schanstra, LPA1 receptor activation promotes renal interstitial fibrosis, *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 18 (2007) 3110-3118.

- [28] A.M. Tager, P. LaCamera, B.S. Shea, G.S. Campanella, M. Selman, Z. Zhao, V. Polosukhin, J. Wain, B.A. Karimi-Shah, N.D. Kim, W.K. Hart, A. Pardo, T.S. Blackwell, Y. Xu, J. Chun, A.D. Luster, The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak, *Nature medicine*, 14 (2008) 45-54.
- [29] H. Ikeda, Y. Yatomi, M. Yanase, H. Satoh, A. Nishihara, M. Kawabata, K. Fujiwara, Effects of lysophosphatidic acid on proliferation of stellate cells and hepatocytes in culture, *Biochemical and biophysical research communications*, 248 (1998) 436-440.
- [30] N. Sakai, J. Chun, J.S. Duffield, T. Wada, A.D. Luster, A.M. Tager, LPA1-induced cytoskeleton reorganization drives fibrosis through CTGF-dependent fibroblast proliferation, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, (2013).
- [31] F.V. Castellino, J. Seiders, G. Bain, S.F. Brooks, C.D. King, J.S. Swaney, D.S. Lorrain, J. Chun, A.D. Luster, A.M. Tager, Amelioration of dermal fibrosis by genetic deletion or pharmacologic antagonism of lysophosphatidic acid receptor 1 in a mouse model of scleroderma, *Arthritis and rheumatism*, 63 (2011) 1405-1415.
- [32] A.M. Abu El-Asrar, L. Missotten, K. Geboes, Expression of autotaxin and acylglycerol kinase in proliferative vitreoretinal epiretinal membranes, *Acta ophthalmologica*, 90 (2012) e84-89.
- [33] H. Tan, S. Biechler, L. Junor, M.J. Yost, D. Dean, J. Li, J.D. Potts, R.L. Goodwin, Fluid flow forces and rhoA regulate fibrous development of the atrioventricular valves, *Developmental biology*, 374 (2013) 345-356.
- [34] C. Rancoule, J.P. Pradere, J. Gonzalez, J. Klein, P. Valet, J.L. Bascands, J.P. Schanstra, J.S. Saulnier-Blache, Lysophosphatidic acid-1-receptor targeting agents for fibrosis, *Expert opinion on investigational drugs*, 20 (2011) 657-667.
- [35] I. Boucher, W. Yu, S. Beaudry, H. Negoro, M. Tran, M.R. Pollak, J.M. Henderson, B.M. Denker, Galpha12 activation in podocytes leads to cumulative changes in glomerular collagen expression, proteinuria and glomerulosclerosis, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 92 (2012) 662-675.
- [36] H. Ikeda, K. Nagashima, M. Yanase, T. Tomiya, M. Arai, Y. Inoue, K. Tejima, T. Nishikawa, M. Omata, S. Kimura, K. Fujiwara, Involvement of Rho/Rho kinase pathway in regulation of apoptosis in rat hepatic stellate cells, *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 285 (2003) G880-886.
- [37] X. Gan, J. Wang, C. Wang, E. Sommer, T. Kozasa, S. Srinivasula, D. Alessi, S. Offermanns, M.I. Simon, D. Wu, PRR5L degradation promotes mTORC2-mediated PKC-delta phosphorylation and cell migration downstream of Galpha12, *Nature cell biology*, 14 (2012) 686-696.
- [38] A. Hahn, J. Heusinger-Ribeiro, T. Lanz, S. Zenkel, M. Goppelt-Struebe, Induction of connective tissue growth factor by activation of heptahelical receptors. Modulation by Rho proteins and the actin cytoskeleton, *The Journal of biological chemistry*, 275 (2000) 37429-37435.
- [39] M.Y. Xu, J. Porte, A.J. Knox, P.H. Weinreb, T.M. Maher, S.M. Violette, R.J. McAnulty, D. Sheppard, G. Jenkins, Lysophosphatidic acid induces alphavbeta6 integrin-mediated TGF-beta activation via the LPA2 receptor and the small G protein G alpha(q), *The American journal of pathology*, 174 (2009) 1264-1279.
- [40] C. Rancoule, R. Dusaulcy, K. Treguer, S. Gres, C. Attane, J.S. Saulnier-Blache, Involvement of Autotaxin/Lysophosphatidic acid signaling in obesity and impaired glucose homeostasis., *Biochimie*, in press (2013).

- [41] S. Gesta, K. Lolmede, D. Daviaud, M. Berlan, A. Bouloumie, M. Lafontan, P. Valet, J.S. Saulnier-Blache, Culture of human adipose tissue explants leads to profound alteration of adipocyte gene expression, *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, 35 (2003) 158-163.
- [42] S. Yoshina, A. Tanaka, S.C. Kuo, [Studies on heterocyclic compounds. XXXIV. Synthesis of furo[3,2-c]pyrazole derivatives. (2). Electrophilic substitution of 1,3-diphenylfuro[3,2-c]pyrazole (author's transl)], *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 98 (1978) 204-209.
- [43] E.J. Yeo, Y.S. Chun, Y.S. Cho, J. Kim, J.C. Lee, M.S. Kim, J.W. Park, YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1, *Journal of the National Cancer Institute*, 95 (2003) 516-525.
- [44] J.S. Saulnier-Blache, A. Girard, M.F. Simon, M. Lafontan, P. Valet, A simple and highly sensitive radioenzymatic assay for lysophosphatidic acid quantification, *Journal of lipid research*, 41 (2000) 1947-1951.
- [45] A. Sahai, P. Malladi, X. Pan, R. Paul, H. Melin-Aldana, R.M. Green, P.F. Whittington, Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin, *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 287 (2004) G1035-1043.
- [46] G.S. Hotamisligil, N.S. Shargill, B.M. Spiegelman, Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance, *Science*, 259 (1993) 87-91.
- [47] M.F. Simon, D. Daviaud, J.P. Pradere, S. Gres, C. Guigne, M. Wabitsch, J. Chun, P. Valet, J.S. Saulnier-Blache, Lysophosphatidic acid inhibits adipocyte differentiation via lysophosphatidic acid 1 receptor-dependent down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ 2, *The Journal of biological chemistry*, 280 (2005) 14656-14662.
- [48] E. Klimcakova, B. Roussel, Z. Kovacova, M. Kovacikova, M. Siklova-Vitkova, M. Combes, J. Hejnova, P. Decaunes, J.J. Maoret, T. Vedral, N. Viguerie, V. Bourlier, A. Bouloumie, V. Stich, D. Langin, Macrophage gene expression is related to obesity and the metabolic syndrome in human subcutaneous fat as well as in visceral fat, *Diabetologia*, 54 (2011) 876-887.
- [49] C. Sengenès, K. Lolmede, A. Zakaroff-Girard, R. Busse, A. Bouloumie, Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells, *Journal of cellular physiology*, 205 (2005) 114-122.
- [50] A. Miranville, C. Heeschen, C. Sengenès, C.A. Curat, R. Busse, A. Bouloumie, Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells, *Circulation*, 110 (2004) 349-355.
- [51] V. Bourlier, C. Sengenès, A. Zakaroff-Girard, P. Decaunes, B. Wdziekonski, J. Galitzky, P. Villageois, D. Esteve, P. Chiotasso, C. Dani, A. Bouloumie, TGF β family members are key mediators in the induction of myofibroblast phenotype of human adipose tissue progenitor cells by macrophages, *PloS one*, 7 (2012) e31274.
- [52] J. Lee, S.Y. Park, E.K. Lee, C.G. Park, H.C. Chung, S.Y. Rha, Y.K. Kim, G.U. Bae, B.K. Kim, J.W. Han, H.Y. Lee, Activation of hypoxia-inducible factor-1 α is necessary for lysophosphatidic acid-induced vascular endothelial growth factor expression, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12 (2006) 6351-6358.

- [53] K. Yang, D. Zheng, X. Deng, L. Bai, Y. Xu, Y.S. Cong, Lysophosphatidic acid activates telomerase in ovarian cancer cells through hypoxia-inducible factor-1alpha and the PI3K pathway, *Journal of cellular biochemistry*, 105 (2008) 1194-1201.
- [54] F. Gao, A. Chattopadhyay, M. Navab, V. Grijalva, F. Su, A.M. Fogelman, S.T. Reddy, R. Farias-Eisner, Apolipoprotein A-I mimetic peptides inhibit expression and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha in human ovarian cancer cell lines and a mouse ovarian cancer model, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 342 (2012) 255-262.
- [55] A. Divoux, K. Clement, Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue, *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 12 (2011) e494-503.
- [56] L.B. Lopes, E.J. Furnish, P. Komalavilas, C.R. Flynn, P. Ashby, A. Hansen, D.P. Ly, G.P. Yang, M.T. Longaker, A. Panitch, C.M. Brophy, Cell permeant peptide analogues of the small heat shock protein, HSP20, reduce TGF-beta1-induced CTGF expression in keloid fibroblasts, *The Journal of investigative dermatology*, 129 (2009) 590-598.
- [57] T.A. Wynn, Cellular and molecular mechanisms of fibrosis, *The Journal of pathology*, 214 (2008) 199-210.
- [58] M. Funke, Z. Zhao, Y. Xu, J. Chun, A.M. Tager, The lysophosphatidic acid receptor LPA1 promotes epithelial cell apoptosis after lung injury, *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 46 (2012) 355-364.
- [59] Y. Qian, M. Hamilton, A. Sidduri, S. Gabriel, Y. Ren, R. Peng, R. Kondru, A. Narayanan, T. Truitt, R. Hamid, Y. Chen, L. Zhang, A.J. Fretland, R.A. Sanchez, K.C. Chang, M. Lucas, R.C. Schoenfeld, D. Laine, M.E. Fuentes, C.S. Stevenson, D.C. Budd, Discovery of highly selective and orally active lysophosphatidic acid receptor-1 antagonists with potent activity on human lung fibroblasts, *Journal of medicinal chemistry*, 55 (2012) 7920-7939.
- [60] J.S. Swaney, C. Chapman, L.D. Correa, K.J. Stebbins, R.A. Bunday, P.C. Prodanovich, P. Fagan, C.S. Baccei, A.M. Santini, J.H. Hutchinson, T.J. Seiders, T.A. Parr, P. Prasit, J.F. Evans, D.S. Lorrain, A novel, orally active LPA(1) receptor antagonist inhibits lung fibrosis in the mouse bleomycin model, *British journal of pharmacology*, 160 (2010) 1699-1713.
- [61] J.S. Swaney, C. Chapman, L.D. Correa, K.J. Stebbins, A.R. Broadhead, G. Bain, A.M. Santini, J. Darlington, C.D. King, C.S. Baccei, C. Lee, T.A. Parr, J.R. Roppe, T.J. Seiders, J. Ziff, P. Prasit, J.H. Hutchinson, J.F. Evans, D.S. Lorrain, Pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of an oral lysophosphatidic acid type 1 receptor-selective antagonist, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 336 (2011) 693-700.
- [62] N. Watanabe, H. Ikeda, K. Nakamura, R. Ohkawa, Y. Kume, J. Aoki, K. Hama, S. Okudaira, M. Tanaka, T. Tomiya, M. Yanase, K. Tejima, T. Nishikawa, M. Arai, H. Arai, M. Omata, K. Fujiwara, Y. Yatomi, Both plasma lysophosphatidic acid and serum autotaxin levels are increased in chronic hepatitis C, *Journal of clinical gastroenterology*, 41 (2007) 616-623.
- [63] A.B. Cooper, J. Wu, D. Lu, M.A. Maluccio, Is autotaxin (ENPP2) the link between hepatitis C and hepatocellular cancer?, *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 11 (2007) 1628-1634; discussion 1634-1625.
- [64] N. Watanabe, H. Ikeda, K. Nakamura, R. Ohkawa, Y. Kume, T. Tomiya, K. Tejima, T. Nishikawa, M. Arai, M. Yanase, J. Aoki, H. Arai, M. Omata, K. Fujiwara, Y. Yatomi, Plasma lysophosphatidic acid level and serum autotaxin activity are increased in liver injury in rats in relation to its severity, *Life sciences*, 81 (2007) 1009-1015.

- [65] M. El-Batch, W. Ibrahim, S. Said, Effect of histidine on autotaxin activity in experimentally induced liver fibrosis, *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 25 (2011) 143-150.
- [66] H. Nakagawa, H. Ikeda, K. Nakamura, R. Ohkawa, R. Masuzaki, R. Tateishi, H. Yoshida, N. Watanabe, K. Tejima, Y. Kume, T. Iwai, A. Suzuki, T. Tomiya, Y. Inoue, T. Nishikawa, N. Ohtomo, Y. Tanoue, M. Omata, K. Igarashi, J. Aoki, K. Koike, Y. Yatomi, Autotaxin as a novel serum marker of liver fibrosis, *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 412 (2011) 1201-1206.
- [67] F.N. Ko, C.C. Wu, S.C. Kuo, F.Y. Lee, C.M. Teng, YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase, *Blood*, 84 (1994) 4226-4233.
- [68] S.Y. Park, K.J. Jeong, J. Lee, D.S. Yoon, W.S. Choi, Y.K. Kim, J.W. Han, Y.M. Kim, B.K. Kim, H.Y. Lee, Hypoxia enhances LPA-induced HIF-1 α and VEGF expression: their inhibition by resveratrol, *Cancer letters*, 258 (2007) 63-69.
- [69] P. Subramanian, E. Karshovska, P. Reinhard, R.T. Megens, Z. Zhou, S. Akhtar, U. Schumann, X. Li, M. van Zandvoort, C. Ludin, C. Weber, A. Schober, Lysophosphatidic acid receptors LPA1 and LPA3 promote CXCL12-mediated smooth muscle progenitor cell recruitment in neointima formation, *Circulation research*, 107 (2010) 96-105.
- [70] K.J. Herr, D.R. Herr, C.W. Lee, K. Noguchi, J. Chun, Stereotyped fetal brain disorganization is induced by hypoxia and requires lysophosphatidic acid receptor 1 (LPA1) signaling, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (2011) 15444-15449.

637

638

639

Table 1: Gene expression in inguinal (IAT) and perigonadal (PGAT) adipose tissue and liver of 13-week-old lean db/m and obese/diabetic db/db mice.

	IAT		PGAT		liver	
	db/m	db/db	db/m	db/db	db/m	db/db
Organ weight (mg)	273 ± 48	3476 ± 172 ***	295 ± 84	2345 ± 80 ***	1125 ± 103	2008 ± 59 ***
Gene expression [mRNA level /β-actin mRNA (x 10 ⁵)]						
<i>Col I</i>	184 ± 44	395 ± 37 **	221 ± 53	396 ± 35 **	3.1 ± 0.3	24.4 ± 5.2 **
<i>Col III</i>	1152 ± 320	2622 ± 305 **	361 ± 74	669 ± 89 *	47 ± 7	204 ± 53 *
<i>Col IV</i>	149 ± 20	446 ± 66 **	268 ± 47	331 ± 57	6.7 ± 1.1	18.7 ± 3.7 **
<i>Fbn</i>	134 ± 40	312 ± 24 *	272 ± 94	465 ± 54 *	3754 ± 696	8357 ± 1137 **
<i>TGFb</i>	28 ± 3	45 ± 5 *	40 ± 7	49 ± 4	4.7 ± 0.7	16.0 ± 1.7 ***
<i>CTGF</i>	10 ± 2	44 ± 7 ***	32 ± 5	33 ± 1	8.6 ± 1.9	42.7 ± 7.7 ***
<i>aSMA</i>	244 ± 39	444 ± 47 **	638 ± 62	326 ± 34 *	13.3 ± 4.1	34.2 ± 3.0 **
<i>MCP1</i>	3.8 ± 0.3	19 ± 5 *	11 ± 4	23 ± 3 *	1.0 ± 0.3	2.2 ± 0.3 **
<i>F4/80</i>	12 ± 2	25 ± 2 **	25 ± 4	42 ± 5 *	10.0 ± 0.5	13.0 ± 1.2 *
<i>ATX</i>	258 ± 44	668 ± 58 ***	252 ± 20	309 ± 40	314 ± 63	584 ± 53 **
<i>LPA1R</i>	37 ± 5	25 ± 2 *	154 ± 18	31 ± 6 ***	4.8 ± 2.5	13.0 ± 1.5 **
<i>LPA2R</i>	2.8 ± 1.3	1.6 ± 0.2	14 ± 5	4.2 ± 0.7 *	2.3 ± 0.6	0.6 ± 0.2 *
<i>LPA3R</i>	1.7 ± 0.2	1.9 ± 0.4	3.5 ± 0.3	0.8 ± 0.2 ***	0.4 ± 0.1	3.1 ± 0.6 **
<i>LPA4R</i>	4.2 ± 0.8	12 ± 1 *	19 ± 2	11 ± 1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
<i>LPA5R</i>	1.7 ± 0.1	7 ± 1 *	4.9 ± 0.3	15 ± 4 *	1.3 ± 0.3	0.9 ± 0.3

640

641

642

Characteristics of db/m (n=6) vs db/db (12) mice: body weight (23. 4 ± 1.3 vs 40.5 ± 0.8 g P<0.001); plasma glucose (145 ± 10 vs 286 ± 36 mg/dl, P<0.01).

643

644

Table 2: Morphometric parameters and plasma composition of db/db mice after treatment with Ki16425.

	Control (n=12)	Ki16425 (n=12)
ITT (AUC)	13778 ± 312	11985 ± 457 *
Fasting plasma insulin (pg/ml)	8351 ± 270	7581 ± 212 *
Fasting blood glucose (mg/dl)	324 ± 27	278 ± 31
Plasma glycated Hg %	5.8 ± 0.3	6.0 ± 0.2
Body weight (g)	39.9 ± 1.0	37.3 ± 1.1
IAT weight (mg)	3476 ± 172	3061 ± 173
PGAT weight (mg)	2345 ± 80	2123 ± 84
Liver weight (mg)	2008 ± 59	1879 ± 97
Cumulative food intake (cumulative g/g body weight)	6.38 ± 0,20	6.84 ± 0,27
ALT (U/L)	79.2 ± 6.5	84.8 ± 10.7
AST (U/L)	87.2 ± 6.2	94.3 ± 13.9
Creatinin (µmol/L)	16.7 ± 1.5	17.5 ± 1.6
Plasma triglycerides (mmol/L)	2.9 ± 0.4	2.8 ± 0.3

645 Db/db mice were treated for 7 weeks with Ki16425 (5 mg/kg/day ip) before
646 analysis. Values are means \pm SEM of 12 mice per group. *p<0.05, **p<0.01,
647 comparing indicated values.

648

Legends of the Figures.

Figure 1. Chronic treatment with Ki16425 downregulates fibrosis genes in adipose tissue of db/db mice. Db/db mice were treated for 7 weeks with Ki16425 (5 mg/kg/day ip) before analysis. Gene expression in inguinal (A) and perigonadal (B) adipose tissues and in liver (D) (see supplemental Table 1 for gene abbreviations): values are means \pm SEM of 12 control (white columns) and 12 Ki16425-treated (black columns) mice. * $p < 0.05$, comparing indicated values. (C) Collagen content in inguinal (IAT) and perigonadic (PGAT) adipose tissue: quantification was performed after staining with Sirius-red as described in Methods (representative staining is shown in Supplementary Figure 1): values are means \pm SEM of 11 control (white columns) and 8 Ki16425-treated (black columns) mice. * $p < 0.05$, comparing indicated values.

Figure 2: In vitro spontaneous production of LPA and fibrosis in adipose tissue. Human adipose tissue explants were maintained in primary culture for 72h in absence of any treatment and gene expression (A, C, E-H) and the concentration of amount of LPA released in the culture medium (B) were analyzed every 24h. (D) collagen protein content was analyzed by Sirius red staining after 72h culture (representative staining is shown in Figure S3). Values are means \pm SEM of 4 separate experiments in A, C, E-H, and 3 separate experiments in D, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparing indicated values.

Figure 3: In vitro profibrotic action of endogenous and exogenous LPA in adipose tissue. Human adipose tissue explants were maintained in primary culture for 72h in the absence (cont) or in the presence of 10 μ M oleoyl-LPA (LPA) or 10 μ M Ki16425 (Ki) or both (LPA+Ki) and AT gene expression was analyzed. Values are means \pm SEM of 3 separate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparing with cont. ## $p < 0.01$ comparing with LPA.

Figure 4: The pro-fibrotic activity of LPA in adipose tissue is mediated through HIF-1 α . (A, B) Gene expression was analyzed in human adipose tissue

explants in primary culture for 72h subjected to different treatments: (A) in the absence (cont) or in the presence of 10 μ M oleoyl-LPA (LPA) or 10 μ M Ki16425 (Ki) or both (LPA+Ki); (B) in the absence (control, white columns) or in the presence of 100 μ M YC-1 (vertical hatched columns) or 10 μ M oleoyl-LPA (black columns) or YC-1 + oleoyl-LPA (inclined hatched columns). (C) Treatments were the same as in B, and was followed by analysis of collagen protein content by Sirius red staining (representative staining is shown in Figure S3). Values are means \pm SEM of 3 separate experiments. * p <0.05, ** p <0.01 comparing with control. ## p <0.01 comparing with 1-oleoyl-LPA.

Figure

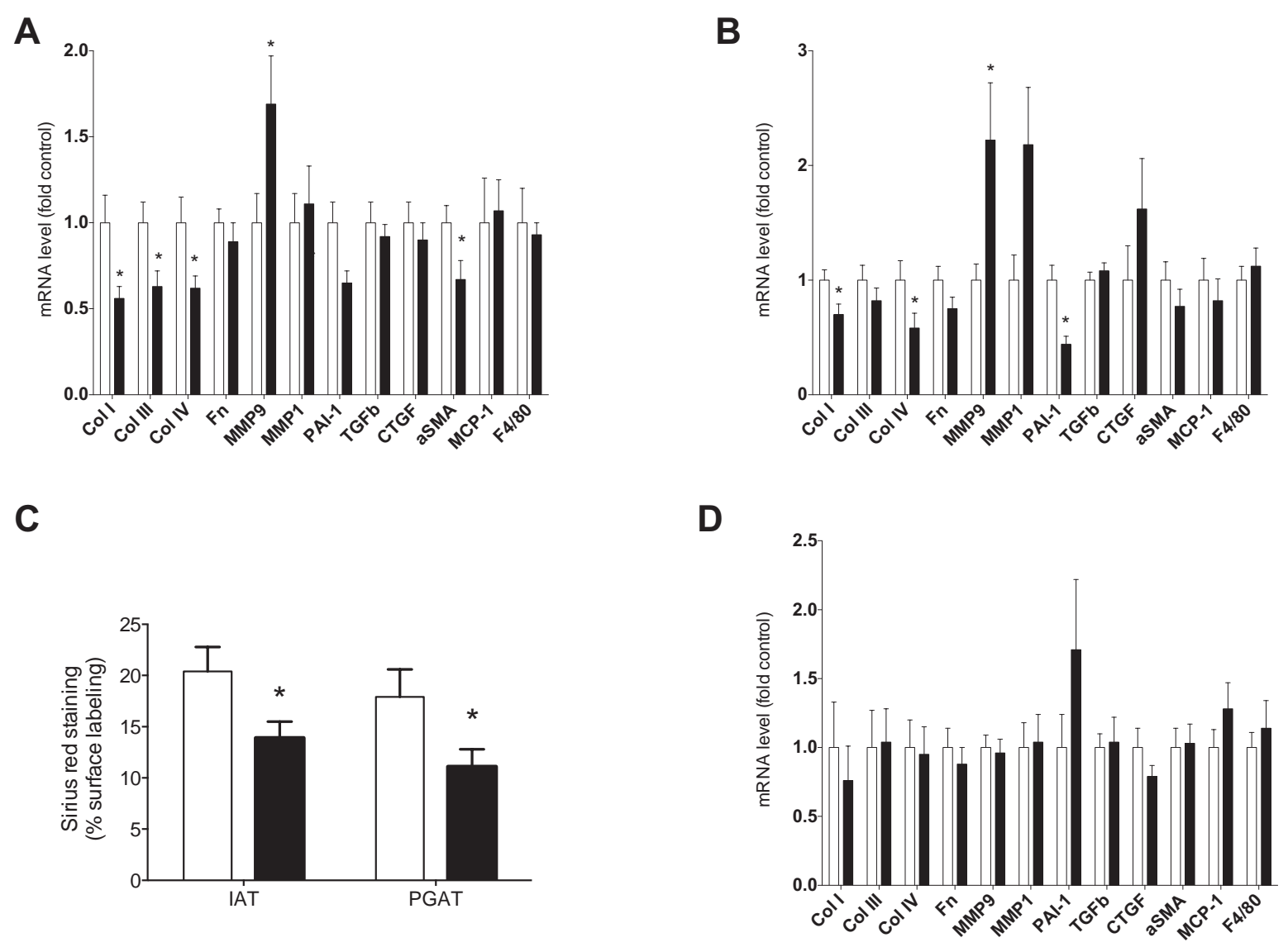


Figure 1.

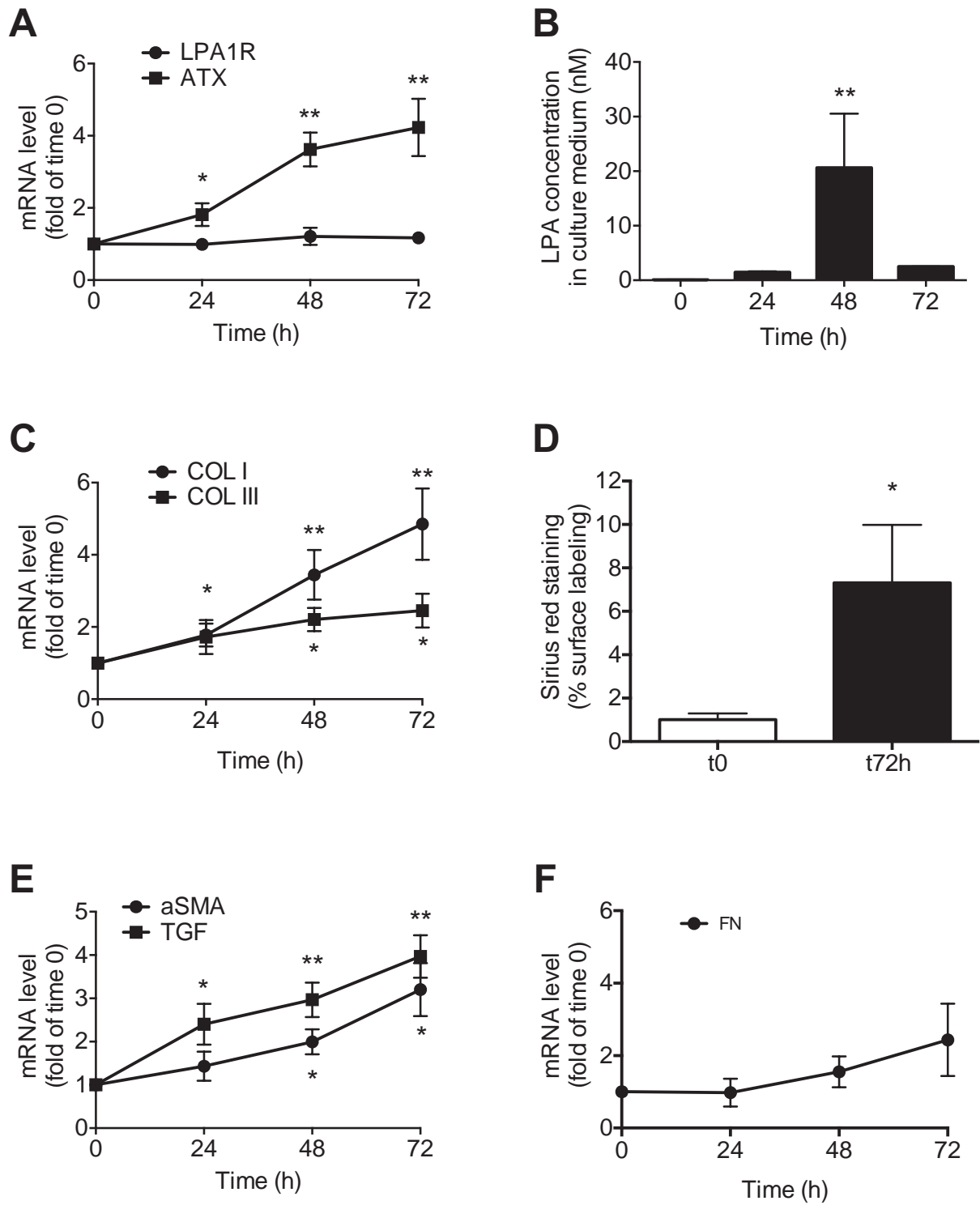


Figure 2.

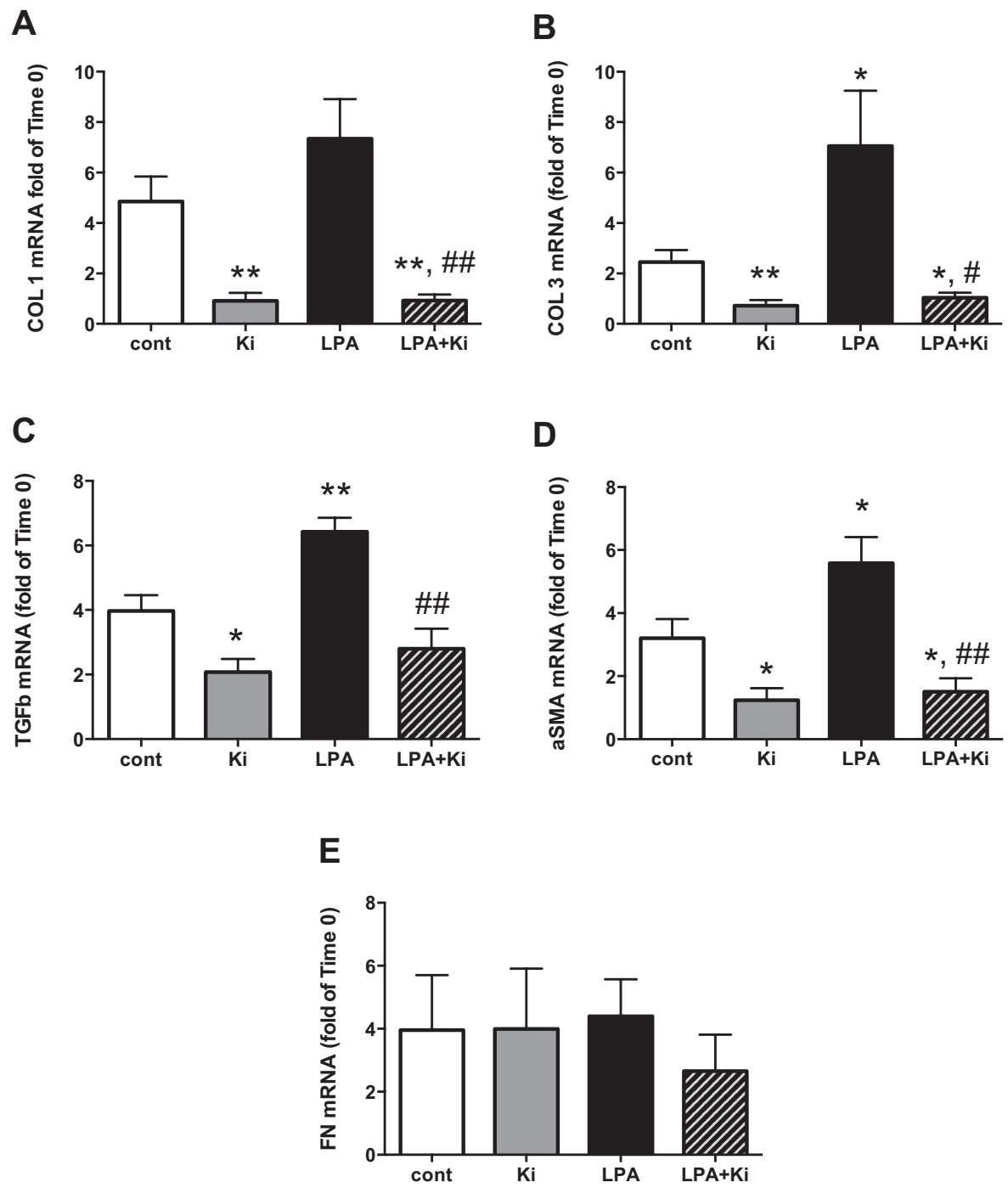


Figure 3.

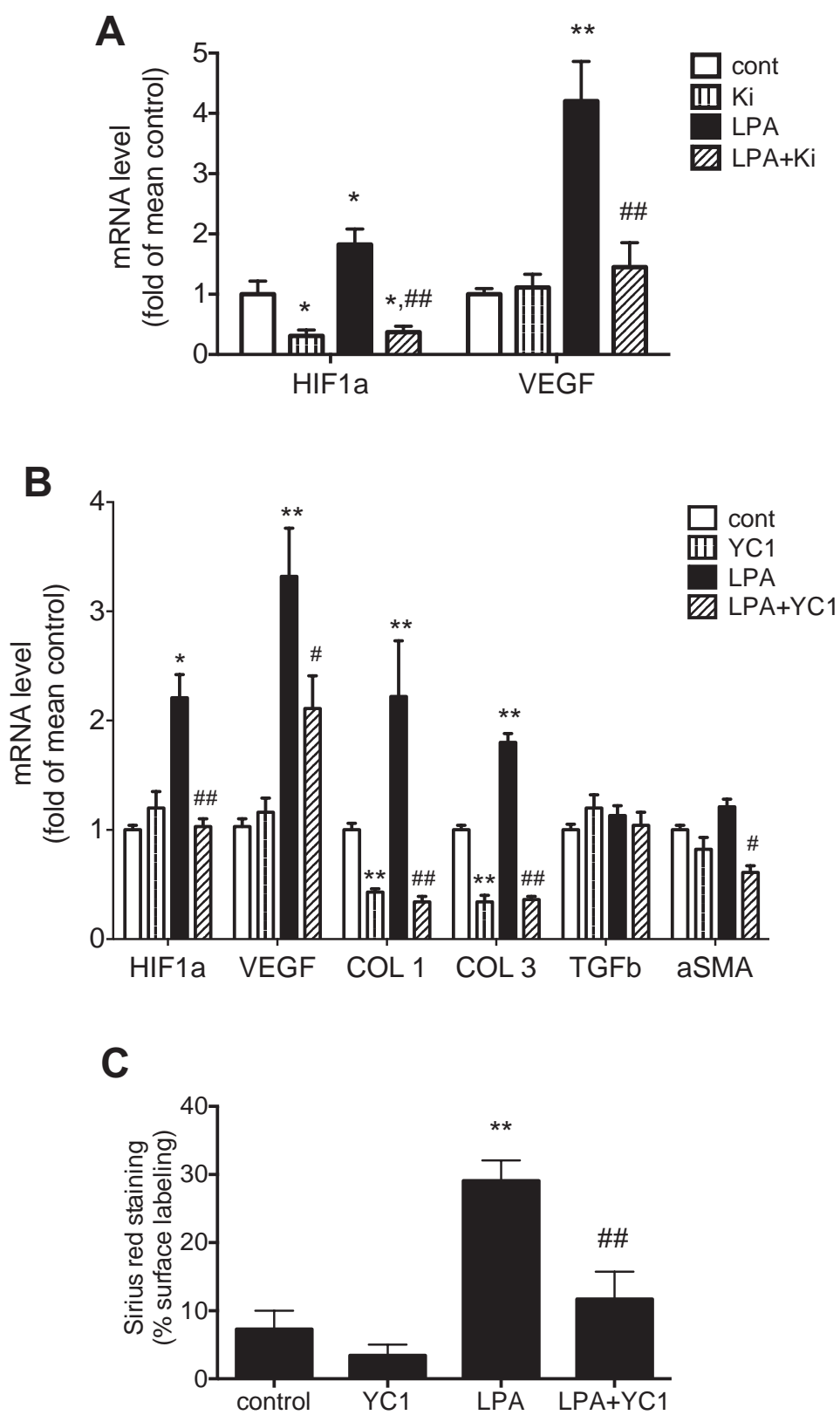


Figure 4

Supplementary Figures.

Figure S1. Chronic treatment with Ki16425 reduces collagen content in adipose tissue of db/db mice. Db/db mice were treated for 6 weeks with Ki16425 (5 mg/kg/day ip) and inguinal (IAT) and perigonadal (PGAT) adipose tissues were stained with Sirius-red as described in Methods (quantification is shown in Figure 1).

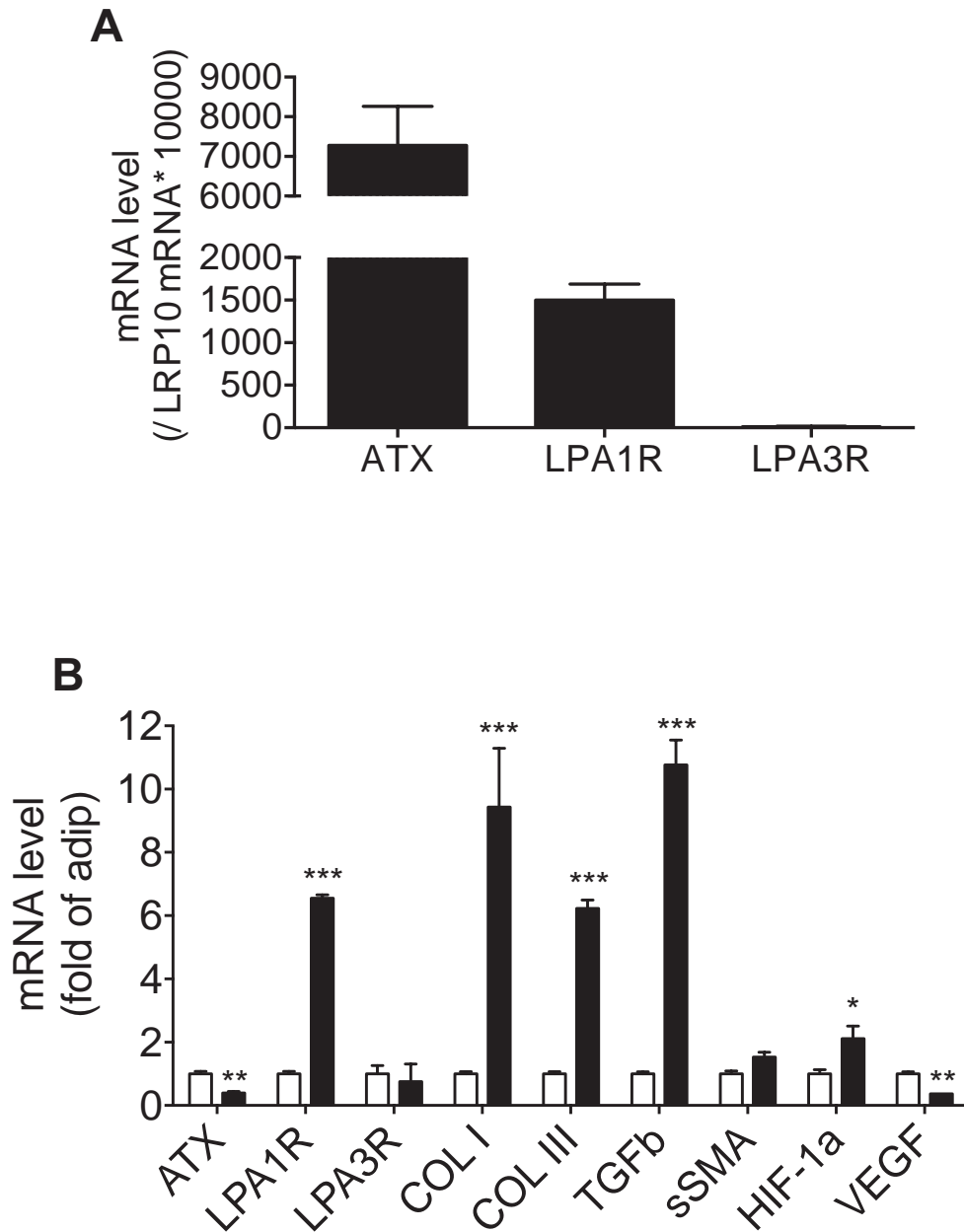


Figure S2. Gene expression was analyzed in whole human adipose tissue (A) and after collagenase digestion (B) and separation of the adipocyte (white columns) and the stroma-vascular (black columns) fractions as described in Methods. Values are means \pm SEM of 3 separate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparing indicated values.

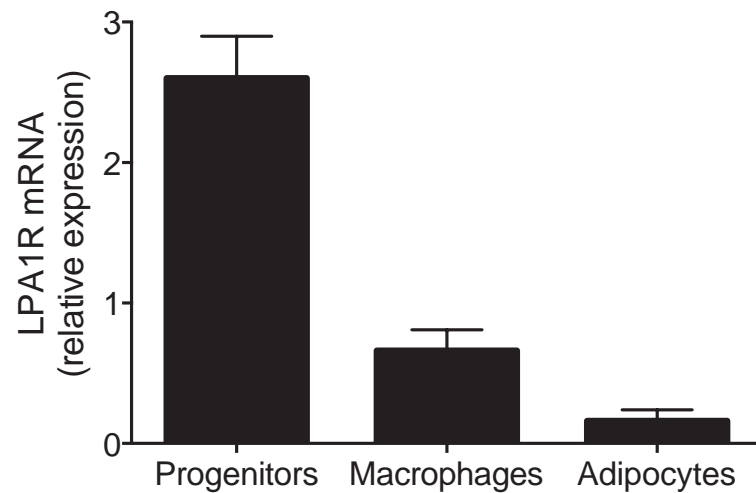
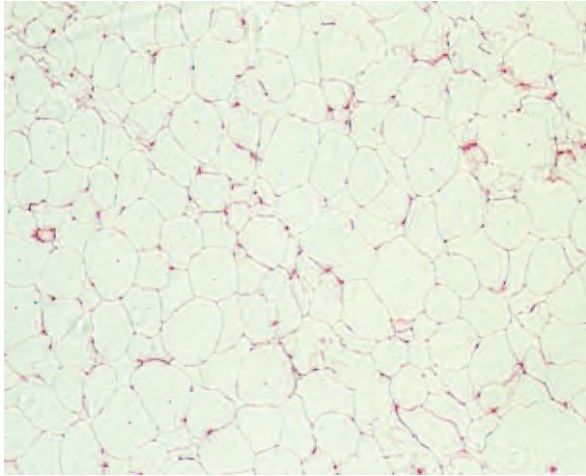
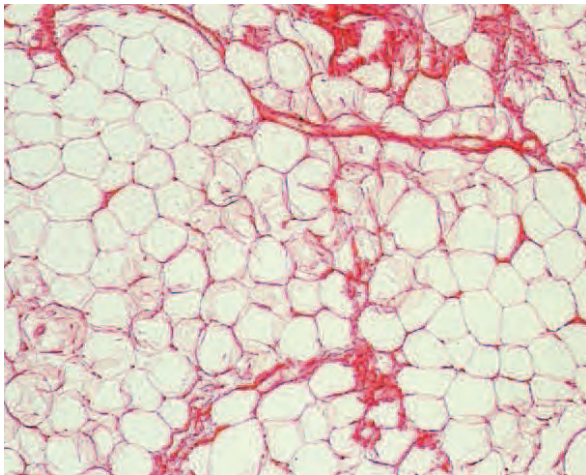
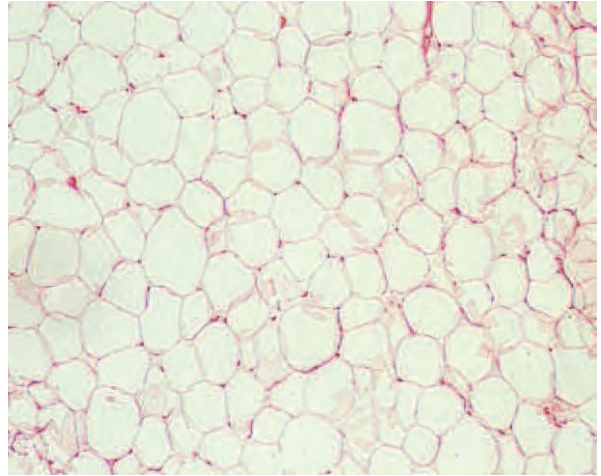


Figure S3. LPA1R mRNA expression in the cell subpopulations of the stroma-vascular fraction (SVF) and isolated adipocytes from human adipose tissue. Adipocytes and SVF were separated after collagenase digestion of subcutaneous abdominal AT from 6 women (BMI $24 \pm 1 \text{ kg/m}^2$, age 36 ± 4 years) (*Klimcakova et al. Diabetologia, 2011, 54:876–887*). CD34+/CD31- progenitor cells and the CD34-/CD14+ macrophages were obtained by immunoselection and depletion of the SVF. DNA microarrays were performed, normalized and analyzed using ANOVA based statistical tests (*Klimcakova et al. Diabetologia, 2011, 54:876–887*). LPA1R expression was significantly higher in progenitor cells than in macrophages and adipocytes (q-values $<0.001\%$). Results are means \pm SD.

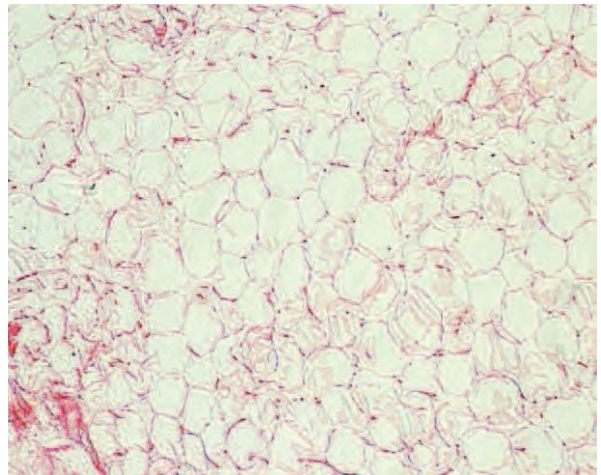
t0



t72h control



t72h LPA



t72h LPA + YC1

Figure S4. In vitro enhancement of adipose tissue collagen content by LPA. Human adipose tissue explants were maintained in primary culture for 72h in the absence (control) or in the presence of 10 μ M oleoyl-LPA (LPA) \pm 100 μ M YC-1. Collagen content was stained with Sirius-red as described in Methods

Supplementary Tables.

Table S1: Sequence of mouse-specific oligonucleotide primer sets used in RT-PCR analysis. *ATX* (autotaxin); *LPA* (LPA receptor); *Col* (collagen); *Fn* (fibronectin); *TGF* (tumor growth factor); *CTGF* (pancreatic and duodenal homeobox); α *SMA* (α -smooth muscle actin); *MCP1* (monocyte chemoattractant protein 1); *F4/80* (mouse homologue of EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1); *MMP* (matrix metalloproteinase); *PAI-1* (plasminogen activator inhibitor-1); *HIF* (hypoxia induced factor); *VEGF* (vascular endothelial growth factor); *LRP10* (Low-density lipoprotein receptor-related protein 10).

	Primer sequence 5' to 3'	
Target genes	Sense	Antisense
<i>ATX</i>	TCCGTGCATCGTACATGAAGA	CAGGACCGCAGTTTCTCAATG
<i>LPA1R</i>	CATGGTGGCAATCTACGTCAA	AGGCCAATCCAGCGAAGAA
<i>LPA3R</i>	GTACCTGAGCCCCCATTG	AAACCCATGCGGAAACAAC
<i>Col I</i>	TGTGTGCGATGACGTGCAAT	GGGTCCCTCGACTCCTACA
<i>Col III</i>	AAGGCGAATTCAAGGCTGAA	TGTGTTTAGTACAGCCATCCTCTAGAA
<i>Col IV</i>	CCGGGATTTACTGGACCACC	CCCTTGCTCTCCCTTGTC
<i>Fn</i>	GGTGTAGCACAATTCCAATTACG	GGAATTTCCGCCTCGAGTCT
<i>TGF</i>	GAGCCCGAAGCGGACTACTA	CACTGCTTCCCGAATGTCTGA
<i>CTGF</i>	GGCATCTCCACCCGAGTTAC	GATTTTAGGTGTCCGGATGCA
α <i>SMA</i>	GTCCCAGACATCAGGGAGTAA	TCGGATACTTCAGCGTCAGGA
<i>MCP1</i>	GCAGTTAACGCCCCACTCA	CCAGCCTACTCATTGGGATCA
<i>F4/80</i>	TGACAACCAGACGGCTTGTG	GCAGGCGAGGAAAAGATAGTGT
<i>MMP-9</i>	TGAGTCCGGCAGACAATCCT	CGCCCTGGATCTCAGCAATA
<i>MMP-1</i>	AAATGGCTCTGAAAACAGGAACA	ACACCAAACCAAAGCAGCAA

<i>PAI-1</i>	TCTCCAATTACTGGGTGAGTCAGA	GCAGCCGGAAATGACACAT
<i>β-actin</i>	GCCTCACTGTCCACCTTCCA	GGGCCGGACTCATCGTACT

Table S2: Sequence of human-specific oligonucleotide primer sets used in RT-PCR analysis. Abbreviations are given in Table S1.

	Primer sequence 5' to 3'	
Target genes	Sense	Antisense
<i>ATX</i>	GGACCAACATCTCCGGATCTT	GGAGGTCCAGCCTCTTGAAGT
<i>LPA1R</i>	TGGGCCATTTTCAACTTGGT	TCTGGCGAACATAGCCAAAGA
<i>LPA3R</i>	TGGGCCATCGCCATTTT	GAGCAGGCAGAGATGTTGCA
<i>Col I</i>	CCCCTGGAAAGAATGGAGATG	TCCAAACCACTGAAACCTCTG
<i>Col III</i>	AAGTCAAGGAGAAAGTGGTCG	CTCGTTCTCCATTCTTACCAGG
<i>Fn</i>	TTAGAGTGTGTGTGTCTTGGTAATGG	CCACGTTTCTCCGACCACAT
<i>TGFβ</i>	CACCCGCGTGCTAATGGT	TGTGTGTACTCTGCTTGAAGTGTCA
<i>αSMA</i>	GATGGCCAAGTCATCACTATTGG	AATGAAGGAGGGCTGGAAGAGT
<i>HIF-1α</i>	CCATTACCCACCGCTGAAAC	TTGAGTGCAGGGTCAGCACTA
<i>VEGF</i>	ACTTCCCCAAATCACTGTGGAT	TGGAGCTCTTGCTACCTCTTTCC
<i>LRP10</i>	GCTCTCCTACAGCCAAGATTGG	GCGCTGGACAGCAGATACAC

- **Principales observations et commentaires**

- Dans ce travail, nous avons montré *in vivo* que le traitement chronique au Ki16425 de souris *db / db* réduit l'expression des collagènes de types I, III et IV et leur accumulation (marquage rouge Sirius) au niveau des dépôts adipeux, en comparaison aux souris témoins. Bloquer la signalisation ATX/LPA dans une situation d'obésité permet de réduire l'apparition de fibrose du tissu adipeux. Le LPA, qui est produit en plus grande quantité en situation d'obésité, semble donc avoir un effet pro-fibrosant au niveau du tissu adipeux. Pour confirmer cela nous avons réalisé un protocole de traitement au LPA (50mg/kg/jour, ip) pendant 4 jours (**protocole complémentaire 4**). A ce temps là de traitement, nous n'observons aucun effet sur le poids du tissu adipeux et, dans les dépôts péri-gonadiques, nous observons une augmentation très nette de l'expression des collagènes (type I et III). Ces données mettent en évidence que l'augmentation des taux de LPA induit des processus de fibrose au niveau du tissu adipeux, et cela, de façon endogène en condition d'obésité, mais aussi lors d'une administration exogène.

- Parallèlement, nous avons mis en place une étude *ex vivo* pour tester l'effet direct du LPA sur la fibrose du tissu adipeux. Dans ce modèle, les explants de tissu adipeux humains en culture surexpriment l'ATX de façon temps-dépendant, ce qui conduit à une augmentation des taux de LPA dans le milieu de culture. Le LPA produit, en agissant sur son (ses) récepteur(s) LPA1/3 entraîne l'apparition d'une accumulation de matrice au sein des explants (ARNm et protéine). Ce modèle a permis aussi de montrer que le Ki16425 était efficace chez l'homme.

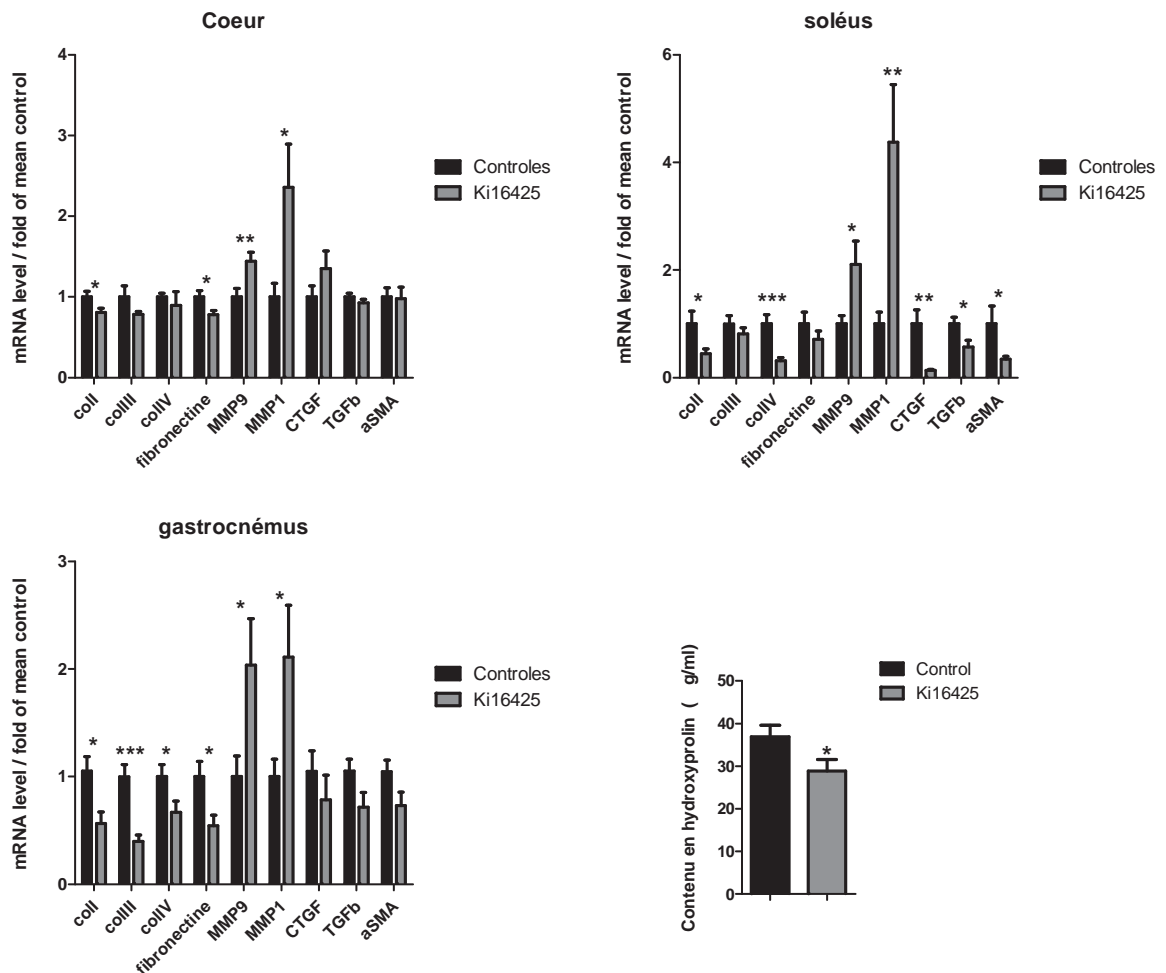
- Dans ce modèle *ex vivo*, nous avons également pu mettre en évidence que cet effet pouvait être dépendant du facteur de transcription HIF1 α , car inhibé par un bloqueur pharmacologique de HIF-1 α , l'YC1 (3-(5'-hydroxyméthyl-2'-furyl)-1-benzyl-indazole). YC1 diminue les quantités de HIF1 α et supprime la capacité de HIF1 à induire l'expression de ces gènes cibles [67, 68, 207, 217, 334, 416, 426]. Il faut cependant être prudent car il exerce également un effet stimulant sur la guanylate synthétase soluble et donc augmente la concentration intracellulaire de GMPc. Les effets observés pourraient donc être imputés à d'autres mécanismes que l'inhibition de HIF, qui a été récemment décrit comme pouvant jouer un rôle dans les processus de fibrose [138]. L'implication de HIF-1 α dans l'effet pro-fibrosant du

LPA demande à être confirmé *in vivo*. Les modèles murins d'obésité développent déjà une augmentation de l'expression de HIF1 α ; est ce que le LPA pourrait amplifier cette augmentation? Un protocole va être lancé au laboratoire. Nous proposons de co-traiter les souris au LPA et à l'YC1; nous espérons ainsi bloquer les effets pro-fibrosants du LPA que nous avons observés lors d'un traitement de 4 jours (50mg/kg/jour, ip).

Dans cette étude, bien que l'on observe une surexpression de VEGF (gène cible de HIF) associé à la surexpression de HIF1 α , nous n'avons pas démontré une augmentation de l'activité de HIF mais uniquement une augmentation de son expression. Les ARNm des gènes hif1 α et hif1 β sont retrouvés dans la plupart des types cellulaires. Leur expression était considérée comme constitutive mais il s'avère qu'elle peut rapidement varier dans certaines conditions [97, 399]. Cependant, la régulation transcriptionnelle des deux gènes HIF1 α et HIF1 β est assez peu illustrée dans la littérature. Pour les régulations transcriptionnelles elles se font indépendamment du statut d'hypoxie/normoxie et sont sous le contrôle de facteurs de transcription dont le plus important est SP1 mais on trouve aussi AP1 et 2 et NFkB. Les régulations post-traductionnelles de la sous-unité 1 α sont régulées par des prolyl hydroxylases (PHD 1-3). Ces trois protéines sont les détecteurs d'oxygène qui permettent à la cellule de produire HIF1 à bon escient [4, 97, 399, 425]. Dans notre cas, il semblerait que l'augmentation de HIF1 α soit due au LPA produit par les explants, mais il est aussi possible que l'augmentation de son activité soit augmentée dans les conditions de moindre oxygénation que représente la culture d'explants.

- En situation d'obésité d'autres tissus sont touchés par ce processus de fibrose. Dans cet article, nous avons montré que le traitement au Ki16425 n'avait aucun effet sur la fibrose hépatique; cependant, nous avons montré que l'injection de 50mg/kg de LPA pendant 4 jours avait un effet sur le foie. Le LPA a un effet pro-fibrosant au niveau du foie, ce qui confirme les données de la littérature, cependant en situation d'obésité, dans nos conditions, bloquer les récepteurs LPA1/3 ne permet pas d'améliorer l'état fibrotique du foie. Ceci peut être expliqué par le fait que le foie exprime beaucoup moins ces récepteurs que les dépôts adipeux. Lors des injections chroniques de LPA nous avons également montré un effet pro-fibrosant au niveau du rein, effet qui avait déjà été décrit (voir introduction bibliographique). Enfin, lors du traitement au Ki16425 des db/db, un autre type de tissu était sensible au traitement: le muscle (voir figure suivante). Cet effet du LPA n'avait jamais été montré. L'apparition de fibroses musculaires associées à l'obésité est aussi un concept assez nouveau [191]. Nos données

suggèrent que le LPA agit également sur la mise en place d'autres fibres en situation d'obésité et notamment au niveau musculaire dans nos protocoles: cœur, soléus, gastrocnémus, EDL. Cet axe d'étude est encore à développer mais il renforce l'effet néfaste et pro-fibrosant du LPA sur un large panel d'organes.



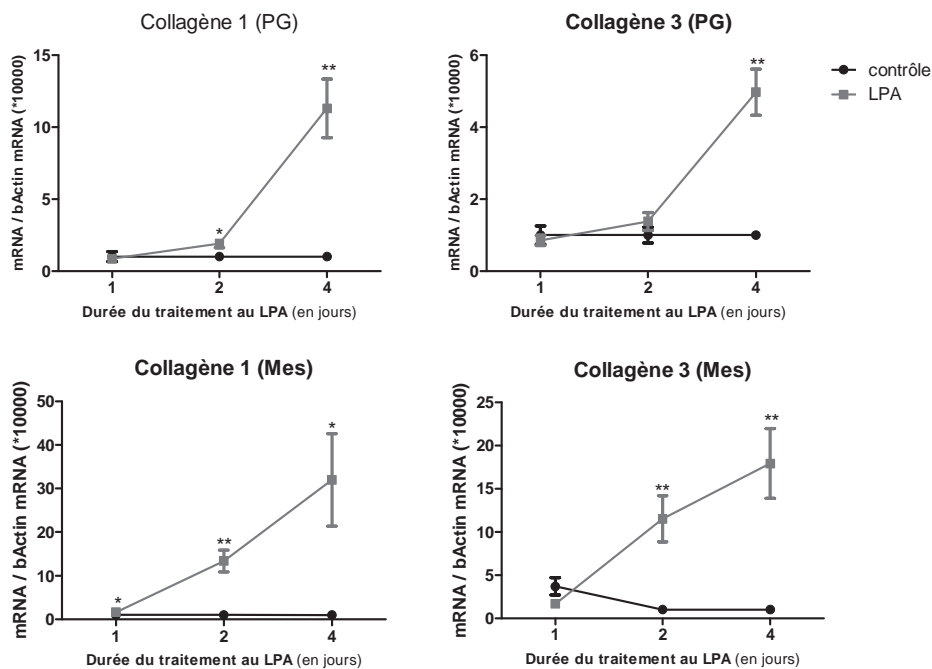
Analyse de l'effet du traitement Ki16425 sur les souris db/db (voir protocole sur l'article6)
Mesure de l'expression génique au niveau de 3 muscles (A: coeur,B: soléus et C: gastrocnémus) et analyse du contenu en oh-proline (acide aminé caractéristique du collagène) en D dans l'EDL
n=12 par groupe
t test *:p<0.5 **:p<0.01, ***:p<0.001

Les médiateurs lipidiques sont aujourd'hui reconnus comme acteurs dans la mise en place de différentes pathologies. De nombreux lipides ont un rôle pro-fibrosant [55] et le LPA, majoritairement décrit comme lipide délétère apparaît comme une cible de choix dans le traitement de la fibrose, notamment en situation d'obésité où ces taux sont augmentés. Le Ki16425, que nous avons proposé précédemment comme traitement pharmacologique

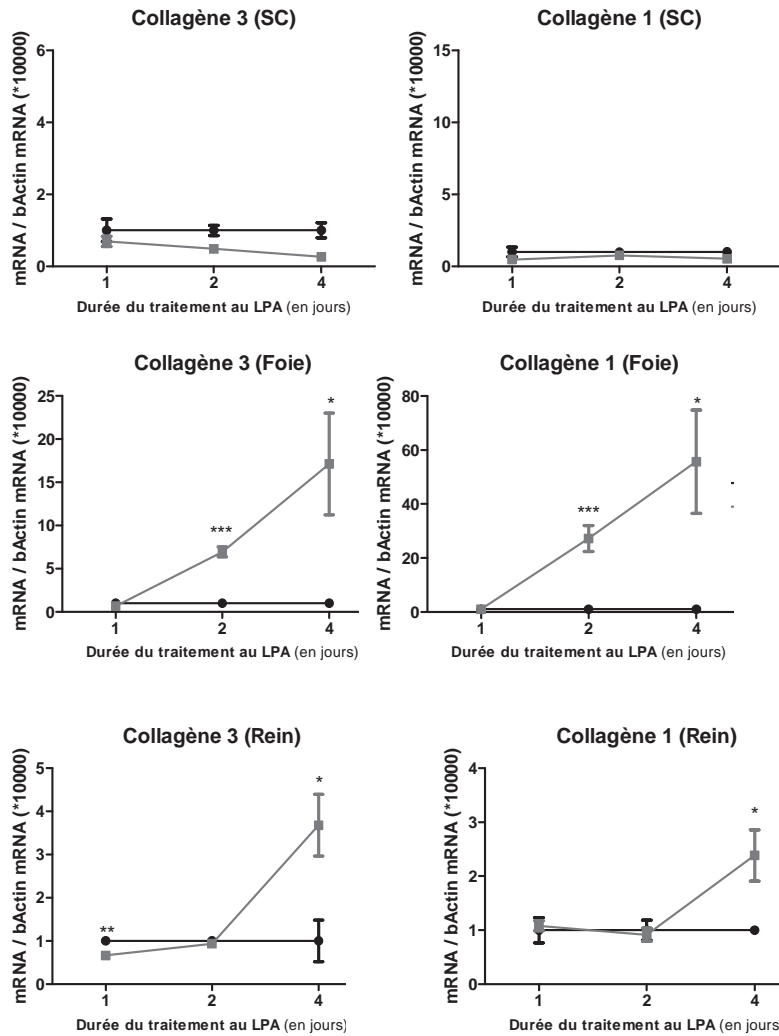
possible pour le diabète de type 2, semble aussi être bénéfique pour une autre complication de l'obésité : la fibrose du tissu adipeux.

III- Protocole complémentaire 4

Des souris de 14 semaines, en régime normal, ont été traitées pendant 4 jours avec du LPA (50mg/kg/jour, ip) ou son véhicule. Voici les résultats obtenus au jour 4 (24 heures après la dernière injection).



Résultats 3 : ATX/LPA et fibrose associée à l'obésité



Expression génique des collagènes 1 et 3 (normalisés à l'expression de la β -actine), mesurée dans différents tissus adipeux (péri-gonadique (PG), sous-cutané (SC), et mésentérique), le foie et le rein, après 1, 2 ou 4 jours de traitement au LPA.

N=4 par groupe

t test *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$ ***: $p < 0.001$

Résultats 4 : Etude clinique

Article 6

Depot-specific regulation of autotaxin with obesity in human adipose tissue.

Rancoule C, Dusaulcy R, Tréguer K, Grès S, Guigné C, Quilliot D, Valet P, Saulnier-Blache JS.

J Physiol Biochem. 2012 Dec;68(4):635-44.

Depot-specific regulation of autotaxin with obesity in human adipose tissue

Chloé Rancoule · Rodolphe Dusauley ·
Karine Tréguer · Sandra Grès ·
Charlotte Guigné · Didier Quilliot ·
Philippe Valet · Jean Sébastien Saulnier-Blache

Received: 4 January 2012 / Accepted: 16 May 2012
© University of Navarra 2012

Abstract Autotaxin (ATX) is a lysophospholipase D involved in synthesis of a bioactive mediator: lysophosphatidic. ATX is abundantly produced by adipocytes and exerts a negative action on adipose tissue expansion. In both mice and humans, ATX expression increases with obesity in association with insulin resistance. In the present study, fat depot-specific regulation of ATX was explored in human. ATX mRNA expression was quantified in visceral and subcutaneous adipose tissue in obese (BMI > 40 kg/m²; *n* = 27) and non-obese patients (BMI < 25 kg/m²; *n* = 10). Whatever the weight status of the patients is, ATX expression was always higher (1.3- to 6-fold) in subcutaneous than in visceral fat. Nevertheless, visceral fat ATX was significantly higher (42 %) in obese than in non-obese patients, whereas subcutaneous fat ATX remained unchanged. In obese patients, visceral fat ATX expression was positively correlated with diastolic arterial blood pressure

(*r* = 0.67; *P* = 0.001). This correlation was not observed with subcutaneous fat ATX. Visceral fat ATX was mainly correlated with leptin (*r* = 0.60; *P* = 0.001), inducible nitric oxide synthase (*r* = 0.58; *P* = 0.007), and apelin receptor (*r* = 0.50; *P* = 0.007). These correlations were not observed with subcutaneous fat ATX. These results reveal that obesity-associated upregulation of human adipose tissue ATX is specific to the visceral fat depot.

Keywords Autotaxin · Adipose tissue · Fat depots · Obesity

Introduction

Autotaxin (ATX) is a secreted lysophospholipase D that catalyzes the hydrolysis of lysophosphatidylcholine into lysophosphatidic acid (LPA), a growth factor-like lipid mediator acting via specific G-protein-coupled receptors [3, 18, 22]. ATX is expressed in several tissues and is present in plasma and other biological fluids. ATX plays a crucial role in embryonic development since its knock-out in mice is lethal as the result of impaired blood vessel formation and failure of neural tube closure [7, 16, 19].

ATX/LPA signaling has mostly been studied for its role in tumorigenesis, angiogenesis, and metastasis [12]. Our group has recently brought ATX/LPA signaling into the area of metabolic diseases by showing the possible involvement of ATX and LPA in obesity and insulin resistance. ATX is abundantly secreted by adipose tissue

C. Rancoule · R. Dusauley · K. Tréguer · S. Grès ·
C. Guigné · P. Valet · J. S. Saulnier-Blache (✉)
Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires
(I2MC), Inserm U1048, Université Paul Sabatier,
Equipe n°3 (Bat L4), 1 Avenue Jean Poulhès, BP 84225,
31432 Toulouse Cedex 4, France
e-mail: Jean-Sebastien.Saulnier-Blache@inserm.fr

D. Quilliot
Service de Diabétologie, Maladies Métaboliques et
Nutrition, Hôpital J. d'Arc, CHU de Nancy,
Nancy, France
e-mail: quilliot.d@orange.fr

Table 1 Sequence of the oligonucleotide primer sets

Target genes	Primer sequence 5' to 3'	
	Sense	Antisense
ATX	GGACCAACATCTCCGGATCTT	GGAGGTCCAGCCTCTTGAAGT
LPA1R	TGGGCCATTTTCAACTTGGT	TCTGGCGAACATAGCCAAAGA
APJ	GCCCTTGCTTTCTGAAAATCA	GGACAGTTAAAGGATGTGCATAGGA
Apelin	GCGGTTATGTCTCCTCCATAGATT	GTGCGAGGTGAGAGCTGAATG
leptin	CCTTCCAGAAACGTGATCCAA	GGCCAGCACGTGAAGAAGAT
CD11b	GGAGTCATTCGCTACGTCATTG	TATTAAGCTCTTGGCGGGATTTC
CD14	CGCCCTGGACTCCCTCAAT	TTGGCTGGCAGTCCTTTAGG
CD68	GGGAGCAGGGTTGAGCAA	AACCGCCTCACCCAAAAGTC
CXCL1	AAACTGTGCCCTTCAGATTGTTG	GCAGGATTGAGGCAAGCTTT
CXCL2	AAGATGCTGAAAAATGGCAAATC	GAACAGCCACCAATAAGCTTCCT
CXCL3	GGGTGGTCCCTGCCCTTA	CTGTCCCTAGAAAGCTGCTGTTC
CXCL12	AAACTGTGCCCTTCAGATTGTTG	GGGTCAATGCACACTTGTCTGT
Cathep	TTGCTGTTTTTGTCTGTGGTTTTTC	CAGACAGGCAGGCAGCATT
TNF- α	CCGAGTCTGGGCAGGTCTAC	TGGGAAGGTTGGATGTTTCGT
iNOS	CTGCCAAGCTGAAATTGAATGA	GATATCTTCGTGATAGCGCTTCTG
LRP1	TAGACCGGCCCCCTGTGCTGTTGA	GGTCTGCCGCGTGCTCGTAGGTGT
SSAO	CCCAGTAGCAGCAGCGTTTT	TGTTGATGAAGTCACTGAAATCCA
MAO-A	ACCAAGCCAGATGGGTCCT	CAGCTTTCCGGGCAAGAAT
MAO-B	CAGCCAGTGACAGGATTACTTT	CATGTAGCCGCTCCAGTGTGT
Adipo	GCAGAGATGGCACCCCTG	GGTTTCACCGATGTCTCCCTTA3'
TGF β	CACCCGCGTGCTAATGGT	TGTGTGTACTCTGCTTGAACCTGTCA
Coll type I	CCCCTGGAAAGAATGGAGATG	TCCAAACCACTGAAACCTCTG
CTGF	ACCAATGACAACGCCTCC	TTGGAGATTTTGGGAGTACGG

ATX autotaxin, LPA1R lyso-phosphatidic acid receptor subtype 1, APJ apelin receptor, CD cluster of different molecules, CXCL C-X-C ligand chemokines, TNF tumor necrosis factor, iNOS inducible nitric oxide synthase, LRP1 low-density lipoprotein receptor-related protein 1, SSAO semicarbazide sensitive amine oxidase, MAO mono amine oxydase, TGF tumor growth factor, Coll collagen, CTGF connective tissue growth factor, Cathep cathepsin D, Adipo adiponectin

leading to the local and systemic production of LPA [4–6, 9, 13]. In vitro, ATX expression and secretion increase during adipogenesis [6, 9], and LPA inhibits adipogenesis via the activation of the LPA receptor

subtype 1 (LPA1R) [15]. In mice, fat expression of ATX is increased with obesity with a tight association with the insulin resistance [2, 4, 6]. Total knockout of LPA1R or fat-specific invalidation of ATX enhances

Table 2 Anthropometric and metabolic characteristics of the obese patients

	Mean	SEM	Min	Max
Age (years)	39.3	1.9	23	60
Body weight (kg)	126.8	3.7	102.8	173.7
Body mass index (kg/m ²)	46.9	1.3	36	64.77
Systolic blood pressure (mmHg)	130.1	3.4	110	173
Diastolic blood pressure (mmHg)	80.0	2.5	60	108
Triglycerides (mM)	1.6	0.2	0.28	6.03
Total cholesterol (mM)	2.0	0.1	1.37	2.78
HDL cholesterol (mM)	0.46	0.02	0.29	0.71
LDL cholesterol (mM)	1.3	0.1	0.57	2.11
Creatinine (mg/l)	8.9	0.4	5	13
Urea (g/l)	0.32	0.01	0.21	0.5
Blood glucose (g/l)	0.94	0.02	0.81	2.36
Plasma insulin (mU/ml)	19.0	1.6	6.1	32.8

nutritional mediated fat mass expansion [4, 15], suggesting that the ATX/LPA signaling constitutes a negative feedback loop on adipose tissue development.

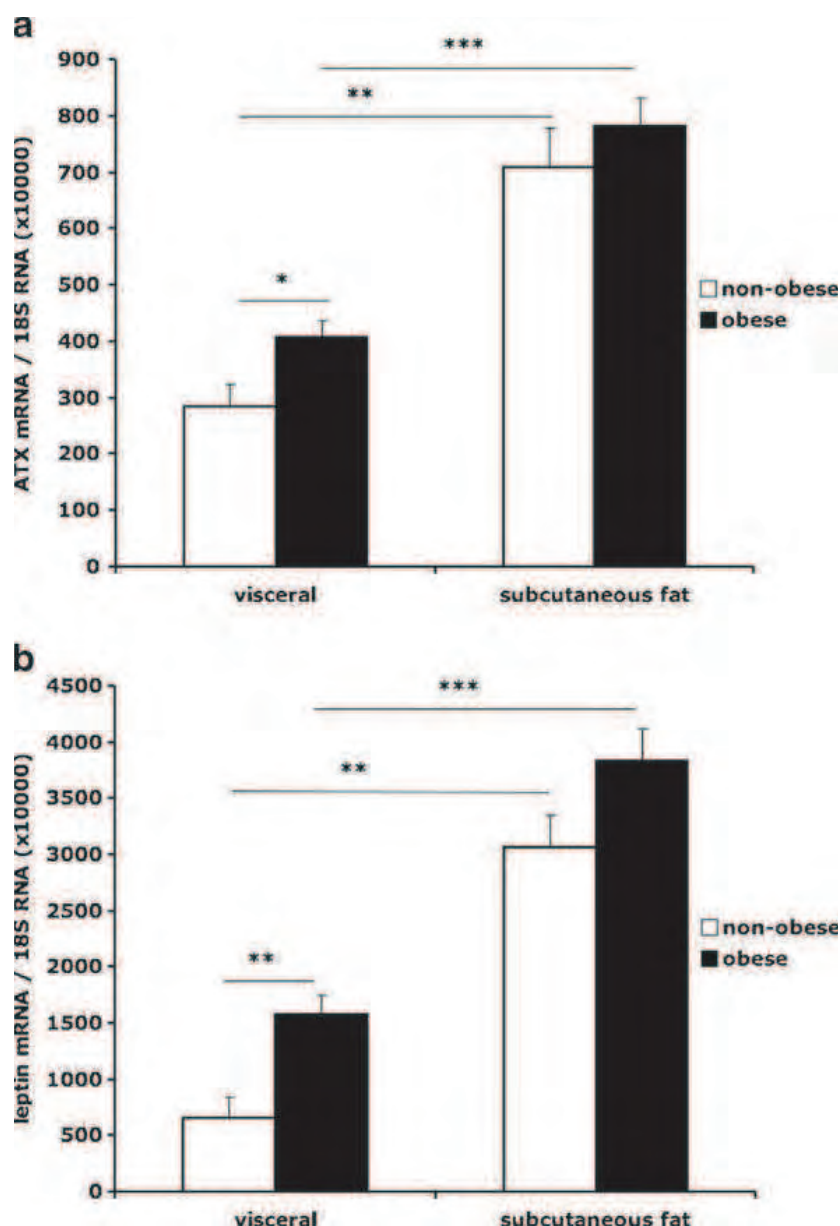
In human, ATX expression is increased in visceral adipose tissue from massively obese patients exhibiting diabetic or prediabetic symptoms when compared to massively obese patients with no diabetic symptoms [2]. This suggested that, as it was observed in mice, fat expression of ATX in human was also related to insulin resistance. Nevertheless, the possible influence of obesity as well as of the localization of the fat pad on the expression of ATX in human remained unexplored. This was examined in the present study.

Material and methods

Human adipose tissue samples

Adipose tissue was collected according to the guidelines of the Ethical Committee of Nancy J. d'Arc Hospitals. All subjects gave their informed consent to participate to the study, and investigations were performed in accordance with the declaration of Helsinki as revised in 2000 (<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>). Subcutaneous and intraabdominal (visceral) fat samples were obtained from the female massively obese patients ($BMI > 40 \text{ kg/m}^2$; $n=27$)

Fig. 1 ATX and leptin expression in visceral and subcutaneous fat depots from obese and non-obese patients. ATX (a) and leptin (b) mRNAs were quantified by RT-PCR analysis. Values are means \pm SE. A bilateral Student's *t* test was used for comparison. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$



before a bariatric surgery. Subcutaneous ($n=4$) and visceral fat ($n=10$) were also collected from non-obese patients ($BMI < 25 \text{ kg/m}^2$). Tissue samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

Analysis of blood parameters

Blood glucose was measured using the glucose oxidase method (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA). Plasma insulin was determined by immunoassay (insulin IMX; Abbott Laboratories, Tokyo, Japan). The intra-assay coefficient of variation was 4 %, and the interassay coefficient was 6 %. Cross-reactivity with proinsulin was 0.05 %. HDL cholesterol was measured after precipitation of apoB-containing lipoproteins

using sodium phosphotungstate/magnesium chloride (Boehringer Mannheim, FRG). Total cholesterol and triglycerides were measured with commercial kits (Boehringer Mannheim, FRG) adapted to a Hitachi 911 analyzer (Japan). LDL cholesterol was calculated according to Friedewald et al. [8] Homeostasis model assessment (HOMA) was used to evaluate insulin sensitivity: $\text{HOMA} = \text{fasting insulin (mU/ml)} \times \text{fasting glucose (mM)} / 22.5$.

mRNA quantification

RNAs were extracted from visceral and subcutaneous fat, and the expression of several genes, including ATX, was determined by quantifying their mRNA

Table 3 Gene expression level in visceral and subcutaneous fat depots from obese and non-obese patients

Genes	Non-obese					Obese					Obese vs non-obese	
	VIS fat		SC fat		VIS vs SC	VIS fat		SC fat		VIS vs SC	VIS	SC
	mean	SE	mean	SE	<i>P</i> value	mean	SE	mean	SE	<i>P</i> value	<i>P</i> value	<i>P</i> value
ATX	285	41	708	72	**	406	31	782	49	***	*	
Leptin	654	195	3,067	283	**	1,578	172	3,828	288	***	***	
SSAO	70,065	12,847	110,799	28,089		114,892	14,642	120,110	8,701		*	
LRP1	0.33	0.04	0.49	0.14		0.49	0.04	0.40	0.03	*	**	
CXCL1	91	26	31	5	*	130	16	33	4	***		
Cathep	2,344	395	2,310	323		2,912	172	3,801	216	***		*
APJ	175	42	268	104		237	27	167	18	***		
TNF- α	6.5	0.7	14.1	1.4	*	8.3	0.9	8.2	0.5			*
CD68	114	12	115	19		186	20	194	18		**	*
CXCL2	404	174	1,081	303		624	151	608	90			
CXCL3	60	27	79	22		52	9	58	7			
CXCL12	802	166	781	181		863	70	911	72			
LPA1R	353	52	263	84		332	20	296	28			
Apelin	23	3	19	4		23	2	17	3			
iNOS	1.5	0.4	1.0	0.4		1.8	0.3	2.1	0.2			
CD11b	40	7	30	7		62	8	45	4		*	
CD14	375	77	259	32		443	39	350	22			
MAOA	12,476	2,968	14,513	4,317		14,822	2,101	12,361	960			
MAOB	6,125	1,057	7,372	1,173		7,002	862	9,376	1,069			
Adipo	484,307	98,265	566,339	175,928		526,792	52,588	590,072	48,145			
TGF β	2.0	0.3	2.5	0.5		1.8	0.1	1.9	0.2			
Coll1	36	10	38	20		19	2	25	9			
CTGF	32	5	30	9		35	3	40	8			

mRNAs were quantified using RT-PCR analysis (see Table 1 for gene abbreviations)

VIS visceral, SC subcutaneous

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

using real-time reverse transcription (RT)-PCR. Total RNAs were extracted from tissues and cells using the RNeasy Mini kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany). Total RNAs (0.5 µg) were reverse transcribed for 60 min at 37°C using Superscript II reverse transcriptase (Life Technology) in the presence of random hexamers. A minus RT reaction was performed in parallel to ensure the absence of genomic DNA contamination. Real-time PCR was performed starting with 25 ng cDNAs and 100 to 900 nM specific oligonucleotide primers in a final volume of 25 µl using the SYBR Green TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystems). Fluorescence was monitored and analyzed in a StepOnePlus real-time PCR system instrument (Applied Biosystems). Analysis of the 18S

ribosomal RNA was performed in parallel using the ribosomal RNA control TaqMan assay kit (Applied Biosystems) in order to normalize the gene expression. Results are expressed as following: $2^{(C_{t18S} - C_{tgene})}$ where C_t corresponds to the number of cycles needed to generate a fluorescent signal above a predefined threshold. Oligonucleotide primers were designed using the Primer Express software (Perkin Elmer Life Sciences) (Table 1).

Statistical analysis

Results are means \pm SE. Intergroup differences were calculated using a bilateral Student's *t* test. Same significances were obtained with a nonparametric analysis.

Fig. 2 Correlation between diastolic blood pressure (mmHg) and ATX expression in visceral (a) and subcutaneous (b) fat depots. ATX mRNAs were quantified by RT-PCR analysis. Correlation analysis was performed by using the two-tailed Spearman correlation test

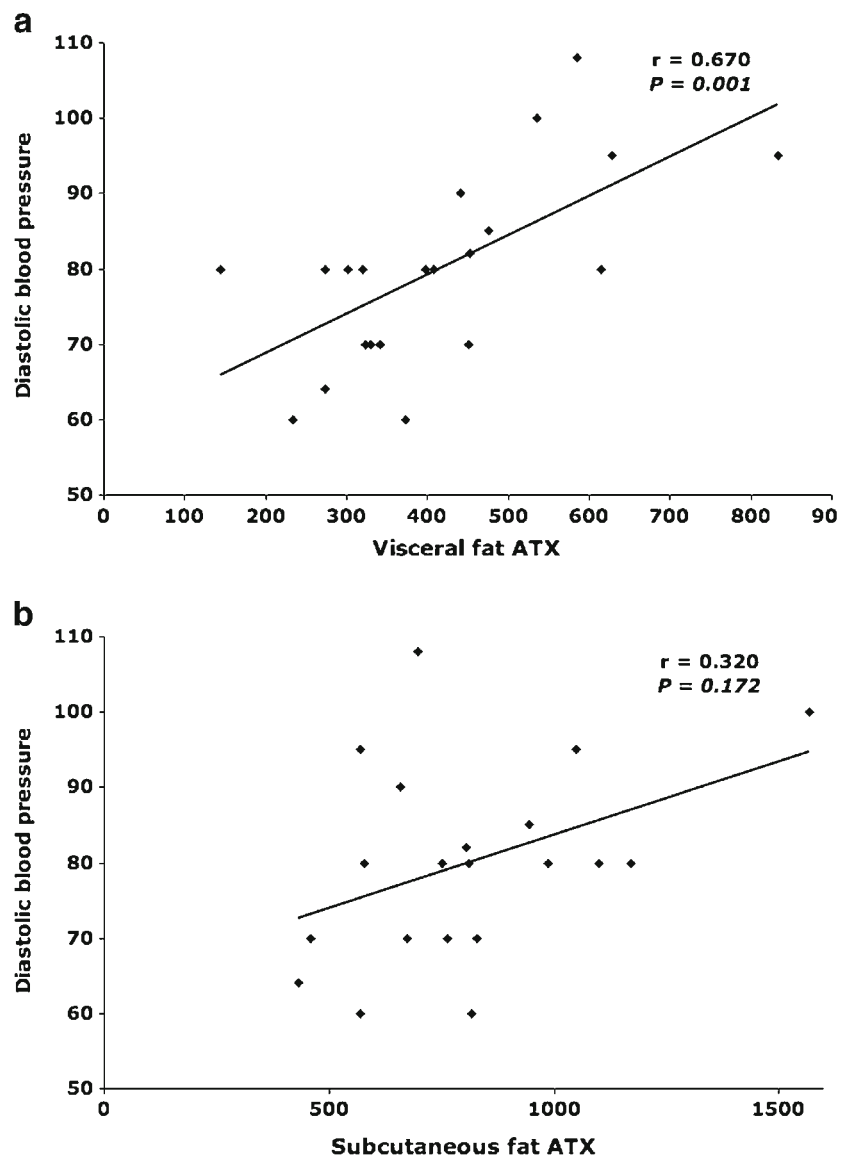


Table 4 Correlation between fat expression of ATX and anthropometric and metabolic characteristics of the obese patients

Parameter	VIS fat ATX		SC fat ATX	
	Spearman r	P value	Spearman r	P value
Age	−0.01	0.946	0.13	0.518
Body weight	0.10	0.633	−0.01	0.954
Body mass index	−0.03	0.899	−0.13	0.542
Systolic BP	0.22	0.346	0.11	0.634
Diastolic BP	0.67	0.001	0.32	0.172
Total CT	0.25	0.209	−0.01	0.965
TG	0.14	0.503	0.16	0.439
HDL CT	−0.11	0.589	0.06	0.775
LDL CT	0.19	0.370	−0.18	0.392
Creatinine	−0.06	0.770	0.45	0.023
Urea	0.14	0.509	0.32	0.117
Blood glucose	0.19	0.429	0.16	0.512
Plasma insulin	0.29	0.292	0.51	0.061

See Table 2 for parameter units. Correlation analysis was performed by using the two-tailed Spearman correlation test

BP blood pressure, CT cholesterol, TG triglycerides, HDL high-density lipoproteins, LDL low-density lipoprotein

The strength of association between variables was calculated using the two-tailed Spearman correlation test for nonparametric variables.

Results

Massively obese patients were insulin-resistant (mean fasting plasma insulin of >15 mU/ml; mean HOMA

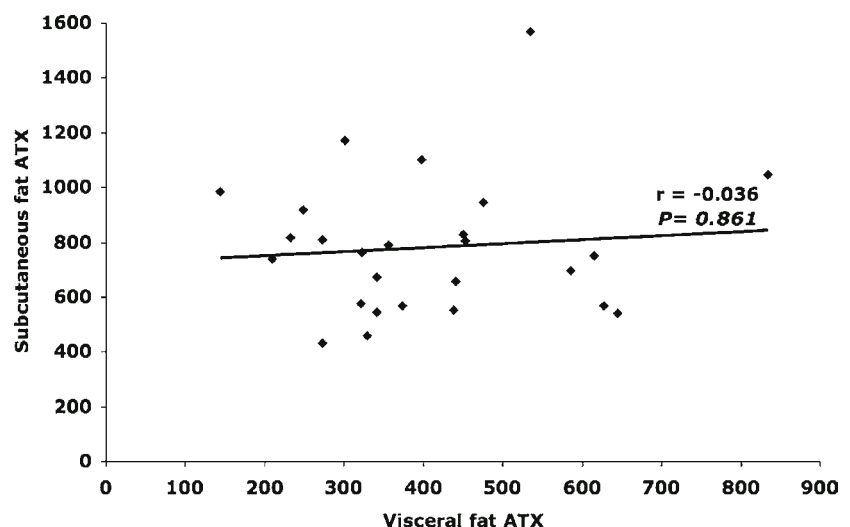
index of 5), but not diabetic (mean fasting glycemia inferior or equal to 1 g/l) (Table 2). They were also slightly hypertriglyceridemic (>1.6 mM) and hypocholesterolemic (total cholesterol of <4 mM; HDL cholesterol of <1.29 mM; LDL cholesterol of <2.58 mM). Plasma creatinine values showed that the patients exhibited normal kidney function (Table 2). Despite a mean systolic blood pressure that was slightly above normal (mean diastolic blood pressure was normal), the patients were not hypertensive. No clinical parameters were available for non-obese patients.

Visceral fat-specific regulation of ATX with obesity

Fat ATX mRNAs were quantified in subcutaneous and visceral fat from obese and non-obese patients along with several other genes (see the gene list in Table 1). In all patients, ATX expression was higher in subcutaneous than in visceral fat (mean of 1.9- and 2.5-fold in obese and non-obese patients, respectively) (Fig. 1 and Table 3). This was also observed for leptin (Fig. 1 and Table 3). Several other genes showed no differential expression (Table 3) reinforcing the specificity of the regulations observed with ATX and leptin. These results revealed the existence of a differential regulation of ATX expression according to the fat depot.

When comparing obese to non-obese patients, a significant increased (42 %, $P=0.021$) in ATX expression was observed in visceral fat, but not in subcutaneous fat (Fig. 1; Table 3). Similar observations were made for leptin, LRP1, semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO), CD68, and CD11b (Table 3). Several other genes showed no such differential expression (Table 3).

Fig. 3 Correlation between visceral and subcutaneous fat ATX expression. ATX mRNAs were quantified by RT-PCR analysis. Correlation analysis was performed by using the two-tailed Spearman correlation test



These results showed the existence of a visceral fat-specific regulation of ATX with obesity.

Correlation analysis

Association with clinical parameters

Interindividual variations of ATX expression were correlated with those of the clinical parameters. This was performed only in obese patients because no clinical parameters were available for non-obese patients. In obese patients, visceral fat ATX was positively correlated with diastolic arterial blood pressure (Fig. 2; Table 4). Interestingly, no significant correlation was observed with systolic blood pressure. The correlation of with arterial blood pressure was not observed with

subcutaneous fat ATX that only showed a weak, but significant correlation with plasma creatinine (Table 4). Interestingly, a significant, but negative correlation was also observed between visceral chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1) and diastolic arterial blood pressure ($r = -0.503$; $P = 0.020$).

Intergene associations

Visceral fat ATX expression was not significantly correlated with subcutaneous fat ATX (Fig. 3). This observation suggested that ATX expression is regulated by distinct factors in the two fat depots.

In visceral fat, ATX was positively associated with leptin (Fig. 4a), apelin receptor (APJ), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and to a lower extent, with

Fig. 4 Correlation between ATX and leptin expression in visceral (a) and subcutaneous (b) fat depots. ATX mRNAs were quantified by RT-PCR analysis. Correlation analysis was performed by using the two-tailed Spearman correlation test

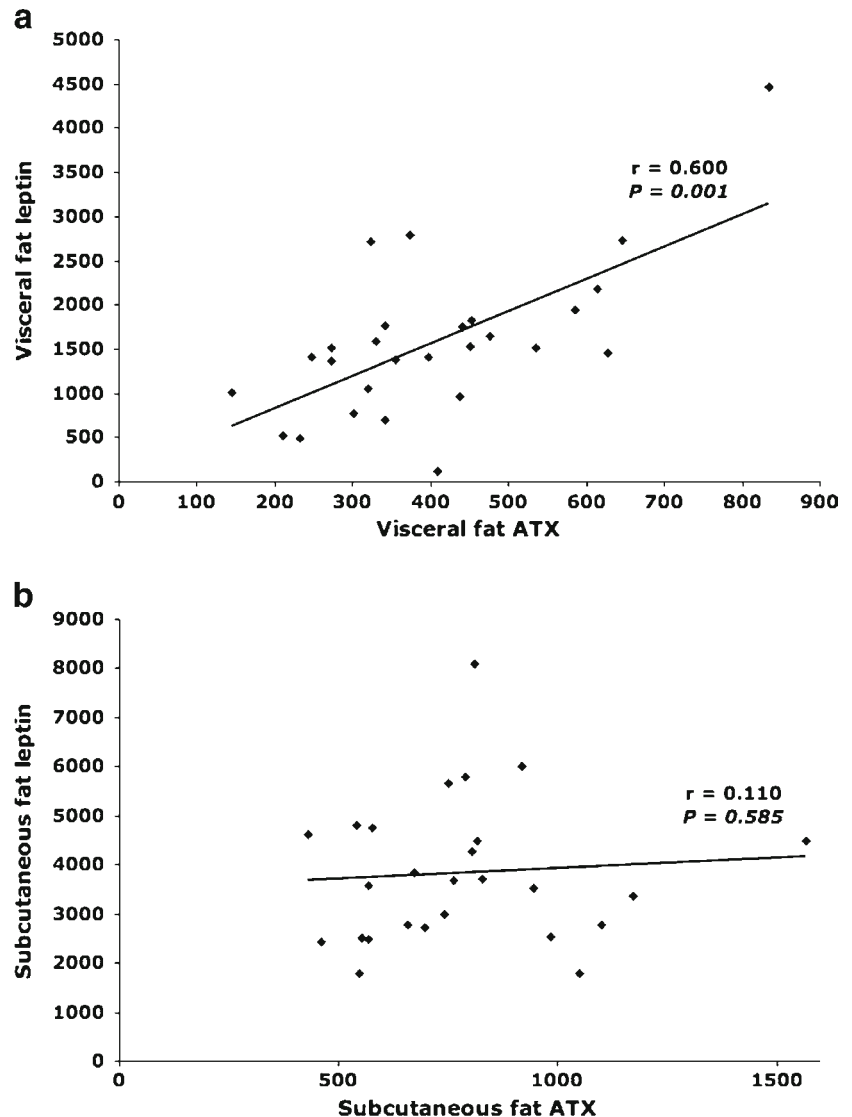


Table 5 Correlations between ATX and other genes in visceral and subcutaneous fat depots from obese patients

Genes	Visceral fat ATX		Subcutaneous fat ATX	
	Spearman (<i>r</i>)	<i>P</i> value	Spearman (<i>r</i>)	<i>P</i> value
LPA1R	0.43	0.027	0.39	0.046
APJ	0.50	0.007	0.07	0.741
Apelin	0.002	0.987	-0.03	0.870
Leptin	0.60	0.001	0.11	0.585
CD11b	0.05	0.815	0.06	0.777
CD14	0.38	0.053	-0.05	0.802
hCD68	0.20	0.339	0.06	0.755
CXCL1	-0.42	0.031	-0.31	0.121
CXCL2	-0.33	0.095	-0.31	0.127
CXCL3	-0.42	0.030	-0.20	0.323
CXCL12	0.43	0.026	0.45	0.021
Cathepsin	0.21	0.297	0.05	0.809
TNF- α	0.41	0.032	-0.14	0.502
iNOS	0.58	0.007	-0.08	0.761
LRP1	0.28	0.153	0.17	0.400
SSAO	0.46	0.018	0.25	0.218
MAOA	0.34	0.093	0.16	0.433
MAOB	0.13	0.532	0.13	0.512
Adiponectin	0.41	0.044	0.34	0.087
TGF β	0.19	0.388	-0.14	0.510
Coll I	0.12	0.577	-0.22	0.303
CTGF	0.11	0.626	-0.21	0.323

mRNAs were quantified using RT-PCR analysis (see Table 1 for gene abbreviations). Correlation analysis was performed by using the two-tailed Spearman correlation test

LPA1R, chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12), SSAO TNF- α , and adiponectin (Table 5). Except for LPA1R and CXCL12, these correlations were not observed with subcutaneous fat ATX (Fig. 4b; Table 5). Visceral fat ATX was also negatively associated with CXCL1 and chemokine (C-X-C motif) ligand 3 (CXCL3) (Table 5). Except CXCL1 that was negatively correlated with diastolic blood pressure ($r=-0.503$; $P=0.020$), the genes that were found associated with ATX were not significantly correlated with this parameter. This suggested that, in visceral fat, ATX and CXCL1 could participate in the regulation of blood pressure conversely to leptin, APJ, iNOS, LPA1R, CXCL12, SSAO TNF- α , CXCL1, CXCL3, and adiponectin. In subcutaneous fat, ATX was positively correlated with CXCL12 and LPA1R (Table 5). Conversely to ATX, these two genes were not correlated with plasma creatinine (Table 5).

Discussion

We found that obesity was associated with a specific upregulation of ATX in visceral, not in subcutaneous fat. Whatever the fat depot is, ATX expression was not correlated with the body mass index of the patients. This suggests that fat ATX expression is not related to global fat mass and reinforces the existence of a fat depot-specific regulation of ATX. Visceral obesity is known to be associated with insulin resistance as the result of the inflammation of the adipose tissue and the production of deleterious adipokines [1]. Here, we observed that, in parallel to ATX, two inflammatory genes (CD11b and CD68) were also upregulated specifically in visceral fat. In addition, visceral ATX was highly correlated with iNOS, a gene usually associated with inflammation. Consequently, visceral-specific regulation of ATX could be related to the obesity-associated inflammation of the visceral fat. This hypothesis is in agreement with our previous reports showing that expression of ATX in cultured adipocyte is upregulated by the proinflammatory cytokine TNF- α and is downregulated with anti-inflammatory compounds [6]. Interestingly, we found a tight correlation between visceral fat ATX expression and diastolic blood pressure in obese patients. These observations suggest the existence of a potential association between visceral fat ATX and the vascular defects associated with obesity. This hypothesis is in agreement with previous reports showing that the product of the lysophospholipase D activity of ATX, lysophosphatidic acid, could play an important role in the development of hypertension and atherosclerosis. LPA has indeed been reported to exert vasopressor effects [17, 21] and to increase the proliferation and the trans-differentiation of vascular smooth muscle cells [20, 23]. In conclusion, visceral fat-specific regulation of ATX with obesity could be determined by a combination of factors, including inflammation, and vascular defects.

Although ATX expression was not upregulated in subcutaneous and visceral fat with obesity, it is noticeable that a significant correlation could be established between ATX and CXCL12 or stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). SDF-1 is a chemokine that plays an important role in angiogenesis in vessel formation [11]. Interestingly, LPA was reported to upregulate SDF-1 expression in human mesenchymal cells isolated from adipose tissue [10]. In addition, invalidation of ATX

gene in mouse is lethal before birth as the result of an abnormal development of the blood vessel network [19]. Moreover, LPA was reported to play an important role in the remodeling of the extracellular matrix and in the development of fibrosis in several organs [14]. Consequently, it could be proposed that the specific association of subcutaneous fat ATX with SDF-1 could be relevant of a contribution of ATX and LPA in the regulation of vessel formation and adipose tissue remodeling.

In conclusion, the present study reveals that adipose tissue ATX is under the control of distinct factor(s) and likely has distinct roles according to the fat depot where it is expressed.

Acknowledgments This work was supported by grants from the INSERM and the Fondation pour la Recherche Médicale (grant #DRM20101220459). Chloé Rancoule and Rodolphe Dusauley were supported by a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie (France).

References

1. Achike FI, To NH, Wang H, Kwan CY (2011) Obesity, metabolic syndrome, adipocytes and vascular function: a holistic viewpoint. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 38:1–10
2. Boucher J, Quilliot D, Praderes JP, Simon MF, Gres S, Guigne C, Prevot D, Ferry G, Boutin JA, Carpenne C, Valet P, Saulnier-Blache JS (2005) Potential involvement of adipocyte insulin resistance in obesity-associated up-regulation of adipocyte lysophospholipase D/autotaxin expression. *Diabetologia* 48:569–577
3. Boutin JA, Ferry G (2009) Autotaxin. *Cell Mol Life Sci* 66:3009–3021
4. Dusauley R, Rancoule C, Gres S, Wanecq E, Colom A, Guigne C, van Meeteren LA, Moolenaar WH, Valet P, Saulnier-Blache JS (2011) Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid. *J Lipid Res* 52:1247–1255
5. Ferry G, Moulharat N, Pradere JP, Desos P, Try A, Genton A, Giganti A, Beucher-Gaudin M, Lonchampt M, Bertrand M, Saulnier-Blache JS, Tucker GC, Cordi A, Boutin JA (2008) S32826, a nanomolar inhibitor of autotaxin: discovery, synthesis and applications as a pharmacological tool. *J Pharmacol Exp Ther* 327:809–819
6. Ferry G, Tellier E, Try A, Gres S, Naime I, Simon MF, Rodriguez M, Boucher J, Tack I, Gesta S, Chomar P, Dieu M, Raes M, Galizzi JP, Valet P, Boutin JA, Saulnier-Blache JS (2003) Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J Biol Chem* 278:18162–18169
7. Fotopoulou S, Oikonomou N, Grigorieva E, Nikitopoulou I, Paparountas T, Thanassopoulou A, Zhao Z, Xu Y, Kontoyiannis DL, Remboutsika E, Aidinis V (2010) ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system. *Dev Biol* 339:451–464
8. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18:499–502
9. Gesta S, Simon MF, Rey A, Sibrac D, Girard A, Lafontan M, Valet P, Saulnier-Blache JS (2002) Secretion of a lysophospholipase D activity by adipocytes: involvement in lysophosphatidic acid synthesis. *J Lipid Res* 43:904–910
10. Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, Cho M, Suh DS, Yoon MS, Chang CL, Jung JS, Kim JH (2008) Cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates differentiation of human mesenchymal stem cells to myofibroblast-like cells. *Stem Cells* 26:789–797
11. Lau TT, Wang DA (2010) Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1): homing factor for engineered regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther* 11:189–197
12. Liu S, Murph M, Panupinthu N, Mills GB (2009) ATX-LPA receptor axis in inflammation and cancer. *Cell Cycle* 8:3695–3701
13. Pradere JP, Tarnus E, Gres S, Valet P, Saulnier-Blache JS (2007) Secretion and lysophospholipase D activity of autotaxin by adipocytes are controlled by N-glycosylation and signal peptidase. *Biochim Biophys Acta* 1771:93–102
14. Rancoule C, Pradere JP, Gonzalez J, Klein J, Valet P, Bascands JL, Schanstra JP, Saulnier-Blache JS (2011) Lysophosphatidic acid-1-receptor targeting agents for fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs* 20:657–667
15. Simon MF, Daviaud D, Pradere JP, Gres S, Guigne C, Wabitsch M, Chun J, Valet P, Saulnier-Blache JS (2005) Lysophosphatidic acid inhibits adipocyte differentiation via lysophosphatidic acid 1 receptor-dependent down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. *J Biol Chem* 280:14656–14662
16. Tanaka M, Okudaira S, Kishi Y, Ohkawa R, Iseki S, Ota M, Noji S, Yatomi Y, Aoki J, Arai H (2006) Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 281:25822–25830
17. Tokumura A, Kume T, Fukuzawa K, Tsukatani H (1981) Cardiovascular effects of lysophosphatidic acid and its structural analogs in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 219:219–224
18. van Meeteren LA, Moolenaar WH (2007) Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis. *Prog Lipid Res* 46:145–160
19. van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, van Rooijen MA, Pradere JP, Pettit TR, Wakelam MJ, Saulnier-Blache JS, Mummery CL, Moolenaar WH, Jonkers J (2006) Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol* 26:5015–5022

20. Xu YJ, Aziz OA, Bhugra P, Arneja AS, Mendis MR, Dhalla NS (2003) Potential role of lysophosphatidic acid in hypertension and atherosclerosis. *Can J Cardiol* 19:1525–1536
21. Xu YJ, Rathi SS, Zhang M, Bhugra P, Dhalla NS (2002) Mechanism of the positive inotropic effect of lysophosphatidic acid in rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 7:109–115
22. Yuelling LM, Fuss B (2008) Autotaxin (ATX): a multi-functional and multi-modular protein possessing enzymatic lysoPLD activity and matricellular properties. *Biochim Biophys Acta* 1781:525–530
23. Zhou Z, Subramanian P, Sevilimis G, Globke B, Soehnlein O, Karshovska E, Megens R, Heyll K, Chun J, Saulnier-Blache JS, Reinholz M, van Zandvoort M, Weber C, Schober A (2011) Lipoprotein-derived lysophosphatidic acid promotes atherosclerosis by releasing CXCL1 from the endothelium. *Cell Metab* 13:592–600

Principales observations et commentaires

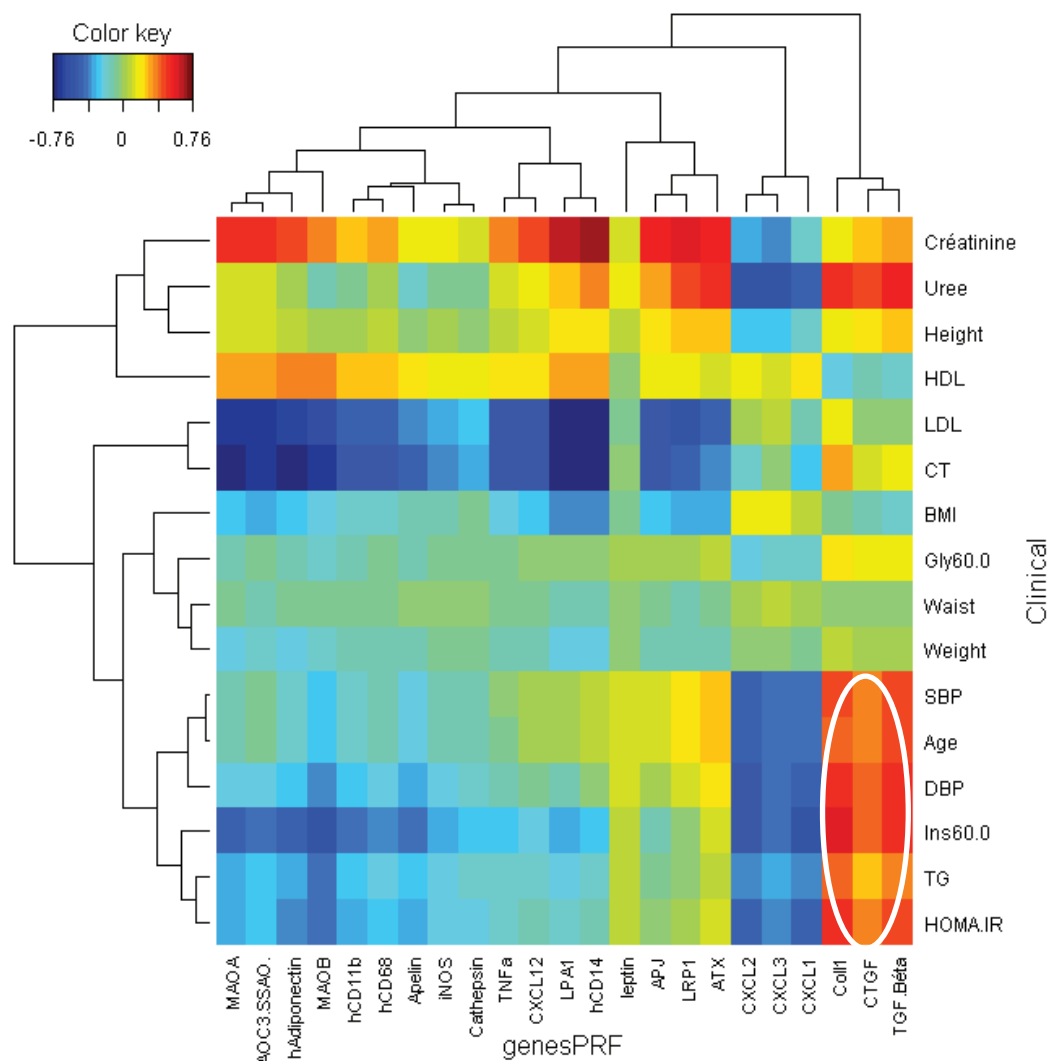
En parallèle de nos études chez la souris, nous avons voulu poursuivre les investigations menées chez l'homme en 2005 [37] concernant la relation ATX/LPA et obésité. Dans ce papier, nous nous sommes intéressés à l'expression de l'ATX dans les dépôts adipeux viscéraux ou sous-cutanés de patients normo-pondéraux ou de patients obèses. Nous avons mis en évidence premièrement que l'expression de l'ATX, quel que soit le statut de l'individu, était plus importante dans les dépôts sous-cutanés que viscéraux. **En situation d'obésité, seul le tissu profond sur-exprime l'ATX** avec une augmentation de moitié environ.

Ces variations sont bien corrélées avec l'expression de la leptine. On peut alors imaginer un lien entre l'expression de l'ATX et la taille adipocytaire. En effet, il est intéressant de noter qu'*in vitro*, au cours de la différenciation adipocytaire, la quantité de LPA présente dans le milieu extracellulaire des adipocytes 3T3F442A augmente [101]. Il est donc possible d'imaginer, qu'à partir d'un certain diamètre, l'adipocyte en cours de différenciation synthétise plus de LPA de manière à ralentir sa propre différenciation ainsi que le recrutement de nouveaux adipocytes. Il serait intéressant de regarder l'existence, dans cette étude, d'une corrélation entre l'ATX et des marqueurs de différenciation adipocytaire tels que aP2, FAS ou LPL par exemple. Au vu du rôle anti-adipogénique du LPA (produit de l'ATX), on comprendrait ainsi que lorsque les adipocytes s'hypertrophient de manière excessive, ce qui est délétère pour l'intégrité du tissu, une boucle de rétrocontrôle négatif se mette en place : l'ATX est sécrétée de manière plus importante, il y a plus de LPA produit et le LPA vient agir de façon à bloquer cette hypertrophie. Ainsi, dans l'article précédent, lorsque les souris sont invalidées au niveau des adipocytes pour l'ATX, l'obésité s'accompagne d'une hypertrophie des adipocytes avec une adiposité augmentée.

Une autre hypothèse est l'induction de l'ATX par l'inflammation du tissu. En effet, le tissu adipeux viscéral est connu pour être un dépôt touché par l'inflammation de bas grade et qui libère en situation d'obésité des cytokines pro-inflammatoires [3]. Des données *in vitro* obtenues dans l'équipe avaient montré qu'en culture le traitement avec du TNF α (une cytokine pro-inflammatoire) induisait une augmentation de l'expression de l'ATX [101].

Les observations que nous avons faites chez la souris sont retrouvées chez l'homme mais uniquement dans le dépôt péri-gonadique.

En parallèle, nous nous sommes servis de ces données pour tester l'existence d'une relation entre l'ATX (mais aussi le récepteur LPA1R) et la fibrose (à partir de 3 marqueurs : collagène 1, CTGF et TGF β). Nous n'avons rien pu montrer de clair. Il serait intéressant de regarder d'autres marqueurs de la fibrose, et surtout de travailler sur des sujets plus malades, puisque dans cette étude aucun d'entre eux n'est diabétique. Nous avons d'ailleurs mis en évidence que les marqueurs de fibrose sont corrélés avec les marqueurs d'insulino-résistance (tels que l'HOMA-IR, l'insulinémie ou la triglycéridémie) et pas avec les marqueurs d'obésité (poids, IMC ou tour de taille) (voir graphique). Les fortes corrélations positives sont en bordeaux et les fortes corrélations négatives sont en bleu marine. Ces données sont en accord avec certaines études [341], bien que d'autres, dans leurs conditions, ne voient pas de corrélations [87].



Analyse canonique des corrélations dans du tissu adipeux profond (réalisée par Balbine Roussel, biostatisticienne, sous r).

Discussion générale

Le LPA est aujourd'hui clairement décrit comme étant un médiateur lipidique puissant. Il est particulièrement étudié dans la sphère du cancer mais son rôle en situation d'obésité n'est jusque là que très peu étudié. La majorité des travaux dans ce domaine ont été réalisés par mon équipe qui a mis en évidence :

1- Que le LPA était produit par les adipocytes, grâce à une lysophospholipase D, l'ATX et que l'expression de l'ATX augmentait en situation d'obésité, en corrélation étroite avec le statut de gluco-intolérance.

Mais ces données de corrélation ne permettaient pas de connaître le rôle de l'axe ATX/LPA sur la mise en place de l'obésité et de l'intolérance au glucose.

2- Que le LPA avait un effet anti-adipogénique sur des pré-adipocytes *in vitro* et que cet effet était dépendant du récepteur LPA1.

Ces données suggèrent un rôle inhibiteur du LPA sur l'expansion du tissu adipeux mais cela nécessite d'être vérifié *in vivo*.

3- Enfin, il avait été montré que le LPA avait un effet pro-fibrosant au niveau de différents tissus.

Mais il n'avait jamais été montré qu'il pouvait avoir un effet au niveau du tissu adipeux où il est justement beaucoup produit.

A partir de ces données, se sont définis les 3 grands axes d'étude développés lors de mes 3 ans de thèse. Grâce à des approches transgéniques et pharmacologiques, j'ai alors pu montrer :

1- Que le LPA exerce effectivement un effet négatif sur l'expansion du tissu adipeux, créant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif en situation d'obésité. Cependant, cet effet ne semble pas lié directement à un effet anti-adipogénique mais pourrait être plutôt lié à un effet délétère sur la capacité des adipocytes à faire de la lipogénèse via une altération possible de la sensibilité à l'insuline des adipocytes. Ces données doivent encore être étudiées ; des tests de sensibilité à l'insuline sur le tissu adipeux pourraient être envisagés dans l'avenir.

2- Que le LPA exerce un effet délétère sur la tolérance au glucose en agissant plus particulièrement sur la sécrétion d'insuline. Cet effet vient renforcer l'effet délétère du LPA sur le stockage des lipides dans le TA. Il est maintenant primordial de comprendre les effets

pancréatiques du LPA. Une étude des effets aigus sur la sécrétion d'insuline est indispensable (avec les voies impliquées à disséquer), mais il serait très intéressant de comprendre également les effets chroniques du LPA qui agit sur le nombre d'ilots de Langerhans. Le LPA étant pro-fibrotique au niveau de différents tissus et sachant que de la fibrose pancréatique se développe en situation d'obésité associée à un diabète [89, 158], on peut imaginer que l'augmentation des taux augmentés de LPA puisse avoir un effet délétère sur le pancréas. Des données préliminaires d'un effet pro-fibrosant du LPA au niveau du pancréas vont d'ailleurs dans ce sens, mais restent à approfondir.

3- Que le LPA induit une fibrose du tissu adipeux. En situation d'obésité, la production adipocytaire de LPA augmente et induit une fibrose du tissu. Il serait intéressant dans l'avenir de voir si cet effet pourrait contribuer à l'effet négatif du LPA sur l'expansion du tissu adipeux. En effet, la littérature montre que le blocage de la fibrose dans un modèle d'obésité induit une augmentation de l'adiposité, associée à une hypertrophie adipocytaire [183, 198, 249].

L'ensemble des effets observés lors de cette thèse pourraient alors être liés les uns aux autres. Ainsi, comme représenté dans ce schéma, nous avons montré qu'en situation d'obésité, l'augmentation de l'expression adipocytaire l'ATX conduisait à une augmentation des taux plasmatiques de LPA.

- Au niveau du tissu adipeux, le LPA, via LPA1/3, limite par une boucle de rétrocontrôle négatif l'expansion du tissu adipeux en bloquant l'hypertrophie adipocytaire. En limitant l'expansion du tissu gras, le LPA pourrait conduire à l'accumulation ectopique de triglycérides, une lipotoxicité et une résistance à l'insuline dans les tissus touchés. Cette hypothèse est une idée nouvelle, reposant sur l'extensibilité du tissu adipeux (traduction de l'anglais expandability); si le tissu adipeux est dans l'incapacité de stocker le surplus d'énergie, s'il ne remplit pas ou plus assez ces fonctions, son rôle de «réservoir» ou de «tampon» [109], des pathologies associées à l'obésité vont se développer et notamment la résistance à l'insuline [85, 241].

L'accumulation de matrice au niveau du tissu adipeux induite par le LPA, pourrait participer à cet effet sur l'expansion du tissu, mais également participer directement à l'apparition d'une résistance à l'insuline dans ce tissu, comme le suggèrent quelques papiers [118, 216].

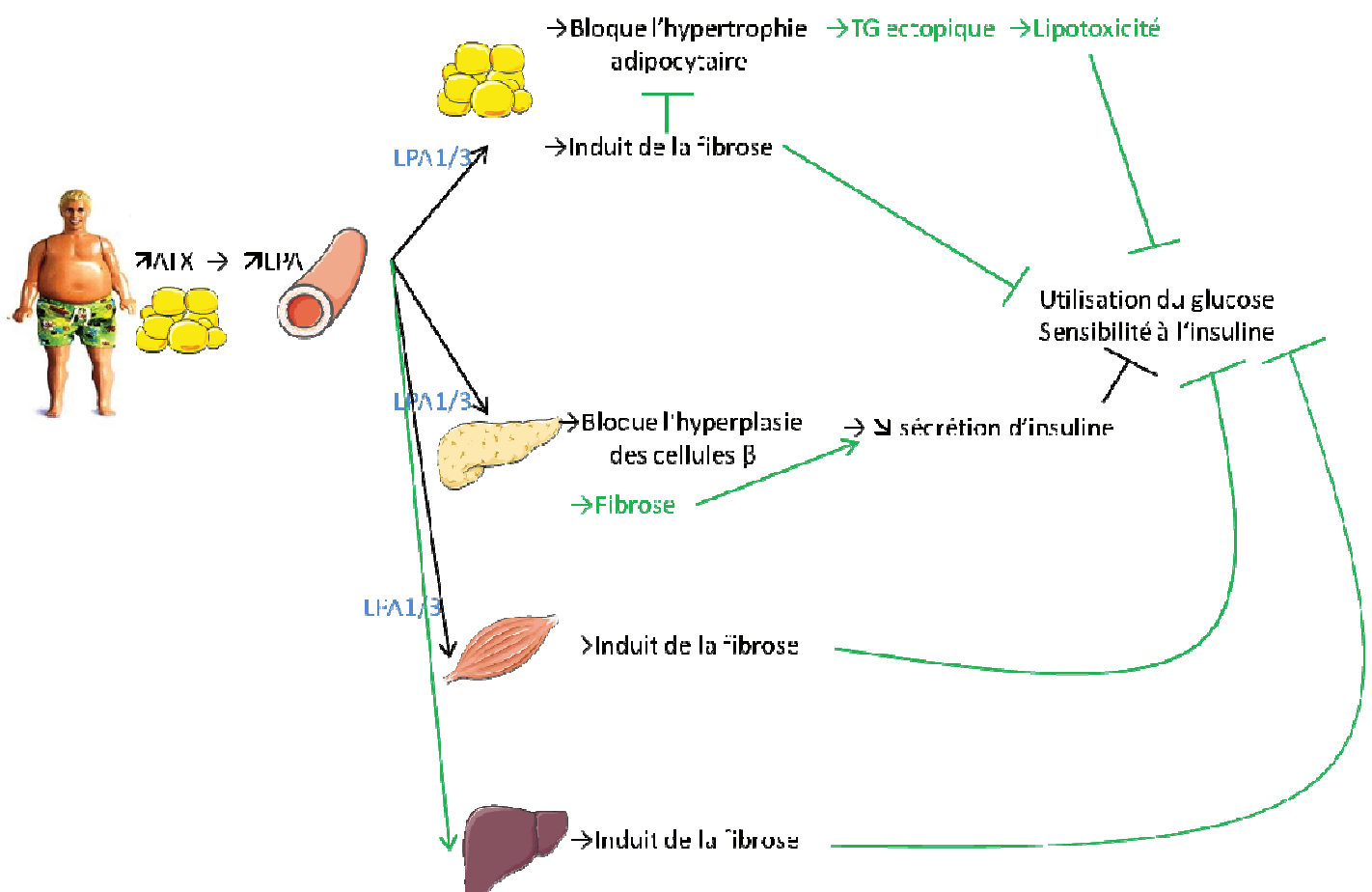
- Au niveau pancréatique, le LPA limite l'expansion des ilots pancréatiques qui existe en situation d'obésité. Il serait intéressant de voir si l'effet pro-fibrosant du LPA pourrait participer à ce défaut de remodelage pancréatique. Le LPA bloque aussi la sécrétion

d'insuline induite par le glucose. La diminution de la sécrétion insulinaire est associée à un défaut de l'utilisation du glucose.

- Enfin, nous avons montré que le LPA avait un effet au niveau pro-fibrosant au niveau de tissus insulino-sensibles tels que le foie et le muscle. Une équipe a montré récemment l'implication de la fibrose musculaire dans le développement d'une insulino-résistance [191, 192]. On peut alors imaginer que via ses effets pro-fibrosants au sein de ces tissus, le LPA puisse induire une résistance à l'insuline de ces tissus, ce qui conduirait à une gluco-intolérance, si toute fois ce qui a été observé dans le muscle et valable au sein du foie.

Schéma 13 :

Bilan et hypothèses



L'ensemble de ces données nouvelles permet de mieux connaître le rôle de l'axe ATX/LPA en situation d'obésité. Les études de cette thèse apportent des preuves pour placer le LPA comme une nouvelle sécrétion lipidique du tissu adipeux qui participe comme de nombreuses autres à la mise en place de l'insulino-résistance, mais aussi à la mise en place de fibroses associées à l'obésité.

Les récepteurs LPA1 et LPA3 sont présents dans de nombreux organes. La fonction de certains de ces organes (tels que le cœur, les vaisseaux, les reins...) est connue pour être modifiée avec l'obésité. On peut donc s'attendre à ce que, en plus de la tolérance au glucose, le LPA puisse participer à d'autres pathologies associées à l'obésité. L'ATX et LPA1/3 représentent donc des cibles pharmacologiques potentielles intéressantes pour le traitement de l'obésité et des troubles associés.

Cibler un RCPG est le mode d'action de plus de 50% des médicaments actuels. On peut alors imaginer que le Ki16425 (antagoniste mixte LPA1/3) soit un bon outil. La démonstration des bénéfices apportés par un traitement au Ki16425 indique qu'il pourrait représenter une cible pharmacologique pour prévenir et / ou traiter les troubles associés à l'obésité. Cependant, c'est un antagoniste mixte, qui cible LPA1 et LPA3 et pourrait aussi bloquer LPA2. Il serait intéressant de travailler avec un antagoniste d'une plus grande spécificité. En outre, LPA1 est un récepteur largement exprimé dans de nombreux tissus. Or, plus la cible de l'agent pharmacologique est diffuse, plus on s'expose à des effets secondaires potentiels et nous pouvons donc imaginer avec le Ki16425 l'apparition d'effets secondaires variés. Par ailleurs, de nombreux inhibiteurs de l'activité enzymatique de l'ATX sont développés actuellement [21, 273]. Ces derniers pourraient être intéressants puisque l'ATX est surexprimée dans le tissu adipeux lorsque l'obésité est associée à l'altération du métabolisme glucidique. Ils permettraient alors de cibler son activité enzymatique potentiellement impliquée dans la physiopathologie de l'insulino-résistance.

Lors de cette thèse nous montrons l'efficacité du Ki16425 dans un modèle physiopathologique. Il ne semble pas illusoire de voir cet objet pharmacologique utilisé en clinique. En effet diverses boîtes pharmacologiques s'intéressent aujourd'hui aux liens LPA/fibrose ou LPA/cancer et jusqu'à présent bloquer l'axe ATX/LPA semble induire majoritairement des effets positifs : diminution de l'apparition de cancers et de leur pouvoir métastatique, diminution des douleurs neuropathiques, effet anti-inflammatoire, diminution de

la fibrose (rein, poumon, et maintenant tissu adipeux et muscle), mais aussi avec cette thèse amélioration du métabolisme glucidique chez l'obèse. Lors de ce travail de recherche nous avons cependant mis en évidence comme effet négatif une prise de masse grasse, mais cet effet est couramment retrouvé avec d'autres molécules antidiabétiques.

Imaginer dans le futur une inhibition de l'axe ATX/LPA ne semble pas donc pas être de la science « fiction » et ces études méritent d'être poursuivies.

Lors de cette thèse, nous avons aussi pu mettre en évidence, une augmentation des taux plasmatiques de LPA en situation d'obésité et nous avons montré que cette augmentation était due à une augmentation de l'expression adipocytaire d'ATX. Or, lors d'une étude précédente, le laboratoire avait mis en évidence plus précisément que l'augmentation de l'expression adipocytaire d'ATX était corrélée au statut de gluco-tolérance du sujet. Il serait alors intéressant de mener une étude plus précise de l'augmentation des taux de LPA plasmatiques lors de la mise en place des altérations métaboliques de l'obèse pour savoir s'il pourrait être utilisé comme biomarqueur de l'apparition d'un statut métabolique altéré. L'expression de l'ATX est régulée par des facteurs inflammatoires. On peut alors imaginer que lors de l'inflammation du tissu adipeux on observe une surexpression de l'ATX, associée à une augmentation des taux plasmatiques de LPA. Ce LPA va pouvoir alors exercer en local mais aussi en systémique des effets délétères freinant l'expansion du tissu adipeux mais participant aussi à la mise en place d'altérations métaboliques et de phénomènes de fibroses dans divers tissus. On pourrait alors voir ce médiateur lipidique comme un initiateur de l'apparition de certaines complications associées à l'obésité et donc comme un biomarqueur du début de l'apparition de ces complications.

Le lien entre taux plasmatiques d'ATX et statut inflammatoire vient d'ailleurs d'être mis en évidence dans une étude qui propose l'ATX plasmatique comme biomarqueur de l'efficacité d'un anti-inflammatoire, la prednisolone [351].

Les taux de LPA et d'ATX peuvent être mesurés dans d'autres fluides. Il a notamment été montré très récemment que les taux de LPA dans le liquide vitreux étaient augmentés chez les patients diabétiques [2].

Ce pan de recherche, ouvert suite à ces travaux de thèse, devrait lui aussi être poursuivi avec une étude plus approfondie.

Annexes

I- Article 3

Involvement of autotaxin/lysophosphatidic acid signaling in obesity and impaired glucose homeostasis.

Rancoule C, Dusaulcy R, Tréguer K, Grès S, Attané C, Saulnier-Blache JS.

Biochimie. 2013 Apr 29. doi:pii: S0300-9084(13)00128-4. 10.1016/j.biochi.2013.04.010



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Mini-review

Involvement of autotaxin/lysophosphatidic acid signaling in obesity and impaired glucose homeostasis

Chloé Rancoule^a, Rodolphe Dusaulcy^a, Karine Tréguer^a, Sandra Grès^a, Camille Attané^b, Jean Sébastien Saulnier-Blache^{a,*}^a Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires (I2MC), Inserm U1048, Université Paul Sabatier, Toulouse, France^b Montreal Diabetes Research Center and CRCHUM, Montreal, QC, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 February 2013

Accepted 11 April 2013

Available online xxx

Keywords:

Lysophosphatidic acid

Receptors

Antagonist

Obesity

Glucose homeostasis

Insulin

ABSTRACT

Autotaxin (ATX) is a secreted lysophospholipase D involved in synthesis of lysophosphatidic acid (LPA), a phospholipid growth factor acting via specific receptors (LPA1R to LPA6R) and involved in several pathologies including obesity. ATX is secreted by adipocytes and contributes to circulating LPA. ATX expression is up-regulated in obese patients and mice in relationship with insulin resistance and impaired glucose tolerance. LPA1R is the most abundant subtype in adipose tissue. Its expression is higher in non-adipocyte cells than in adipocytes and is not altered in obesity. ATX increases and LPA1R decreases while preadipocytes differentiate into adipocytes (adipogenesis). LPA inhibits adipogenesis through down-regulation of the pro-adipogenic transcription factor PPAR γ 2. Adipocyte-specific knockout (FATX-KO) mice or mice treated with the LPAR antagonist Ki16425 gain more weight and accumulate more adipose tissue than wild type or control mice fed a high fat diet (HFD). These observations suggest that LPA (via LPA1R) exerts a tonic inhibitory effect on adipose tissue expansion that could, at least in part, result from the anti-adipogenic activity of LPA. A possible negative impact of LPA on insulin-sensitivity might also be considered. Despite being more sensitive to nutritional obesity, FATX-KO and Ki16425-treated mice fed a HFD show improved glucose tolerance when compared to wild type mice. Moreover, exogenously injected LPA acutely impairs glucose tolerance and insulin secretion. These observations show that LPA exerts a tonic deleterious impact on glucose homeostasis. In conclusion, ATX and LPA1R represent potential interesting pharmacological targets for the treatment of obesity-associated metabolic diseases.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Autotaxin/lysophosphatidic acid receptor functions

Autotaxin (ATX) is a glycosylated secreted enzyme of approximately 120 kDa made of several domains, including a catalytic site responsible for lysophospholipase D activity generating lysophosphatidic acid (LPA) from other lysophospholipids such as lysophosphatidylcholine [1]. ATX is expressed in many organs in animals and humans, especially in brain, lymph nodes and adipose tissue. ATX is also present in the blood where it contributes to circulating levels of LPA [2,3]. Complete knockout of ATX in mice is lethal as the result of an impaired neurogenesis and vasculogenesis

of the embryo [2–5]. Heterozygous ATX knockout are normal but display 50% reduction in plasma LPA concentration [2].

LPA is a phospholipid growth factor acting through specific G-protein coupled receptors (LPA1R to LPA6R) [1]. LPA elicits a wide range of cell responses (contraction, aggregation, calcium mobilization, chemotaxis, neurotransmitter release, cell proliferation, cell transformation) [6], and has been associated with the etiology of a growing number of disorders including cardiovascular diseases (cardiac ischemia, heart hypertrophy, atherosclerosis, cancer, neuropathies, obesity, and fibrosis [6,7]). LPA1R, LPA2R and LPA3R are members of the endothelial differentiation gene family encompassing the receptors for sphingosine-1-phosphate. LPA4R and LPA6R belong to the purinergic GPCR family, and LPA5R belongs to the GPR family [7]. LPA1R is the most widely distributed subtypes throughout the organism. LPA1R-KO mice [8] have a reduced perinatal survival and exhibit behavioral and developmental alterations such as a reduced body size and alteration of the suckling behavior. The loss of LPA1R *in vivo* modulates several diseases

* Corresponding author. Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires (I2MC), Inserm U1048/Université Paul Sabatier Equipe no 3 (Bat L4), 1 avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France. Tel.: +33 5 61 32 56 36; fax: +33 5 61 32 56 23.

E-mail address: Jean-Sebastien.Saulnier-Blache@inserm.fr (J.S. Saulnier-Blache).

including cancer, obesity, neuropathic pain, fibrosis and male infertility [9]. LPA2R-KO mice exhibit no major phenotypic alterations [10]. LPA3R-KO mice exhibit an abnormal embryo implantation in the uterus [11,12]. Whereas LPA4R-KO mice were initially reported to exhibit no major phenotypic alteration [13], a subset of LPA4R-KO embryos display alterations in blood and lymphatic vessel formation [14]. LPA5R-KO mice show no obvious phenotype except that they are protected against neuropathic pain induced by partial sciatic nerve ligation [15].

2. Obesity-associated regulation of the ATX/LPA axis in adipose tissues

ATX is abundantly secreted by adipose tissue where it is 2–3 times more expressed in adipocytes than in the stromal-vascular cells containing, among others, the preadipocytes [16,17]. Conversely to total KO, adipocyte-specific KO mice (FATX-KO) are viable [18]. When fed a normal chow diet, FATX-KO mice show 40% reduction in plasma LPA when compared to wild type mice [18] demonstrating the contribution of adipose tissue in the overall production of LPA in the body. Adipocyte ATX expression and plasma LPA are up-regulated in obese mice fed a high fat diet (HFD) [18]. These increase are suppressed in FATX-KO mice [18]. Adipocyte expression of ATX is also increased in genetically obese diabetic db/db mice in correlation with their insulin resistance state rather than with their fat mass [16,17,19]. In human, ATX expression is higher in subcutaneous than in visceral fat [20]. Whereas obesity has no influence on subcutaneous fat ATX, visceral fat ATX is higher in obese than in non-obese patients and is strongly correlated with leptin expression [20]. ATX expression is also up-regulated in massively obese patients exhibiting diabetes or impaired glucose tolerance when compared to massively obese patients with normal glucose homeostasis [19]. Thus, as in mice, obesity-associated impairment of glucose homeostasis impacts ATX expression in human.

LPARs are expressed in adipose tissue with LPA1R being the most abundant subtypes [21]. LPA1R expression is lower in adipocytes than in the stromal-vascular cells containing, among others, the preadipocytes [22]. In human beings, obesity has no major influence on LPA1R expression in adipose tissue [20]. Above different observations, show that, in adipose tissue, obesity alters LPA synthesis rather than LPA sensitivity.

3. ATX/LPA signaling inhibits adipogenesis *in vitro* and fat mass expansion *in vivo*

In preadipose cell lines (3T3F442A, 3T3-L1) and in primary pre-adipocytes isolated from adipose tissue adipocytes, ATX expression and secretion increase strongly while preadipocytes differentiate into adipocytes (adipogenesis), and this is associated with a strong accumulation of LPA in the extracellular medium [17,23]. Expression of ATX in differentiated adipocyte in culture is down-regulated by thiazolidinediones [17] or prednisolone [24] and up-regulated by TNF α [17] three compounds known to influence adipocyte insulin sensitivity. Conversely to ATX, LPA1R is more abundant in undifferentiated preadipocytes when compared to differentiated adipocytes [22,25]. LPA increases preadipocyte proliferation [22,25,26] through LPA1R [21] and the activation of the ras/MAPK pathway [22,27,28]. LPA inhibits adipogenesis of preadipose cell lines (3T3F442A and SGBS) and of primary white [21,22] and brown preadipocytes [29]. The anti-adipogenic activity of LPA is mediated by LPA1R since it is lost in preadipocytes from LPA1R-KO mice [21]. The anti-adipogenic activity of LPA results from a down-regulation of the pro-adipogenic transcription factor PPAR γ 2 [21] via the Rho kinase pathway and delayed activation of the Wnt-signaling [30,31].

Above observations suggest that ATX/LPA signaling could negatively influence adipose tissue development.

Because of their developmental deficiencies [8], LPA1R-KO mice show reduced body size and weight. Despite such phenotype, LPA1R-KO mice under a regular chow diet have a higher fat mass when compared to their wild type counterpart [21]. This is accompanied by larger adipocytes (Daviaud D and Saulnier-Blache, personal results), higher plasma leptin [21] and higher adipocyte expression of leptin and GLUT-4 [32].

FATX-KO mice display no detectable phenotype when fed a normal chow diet, when compared to wild type mice [18]. When fed a high fat diet, FATX-KO mice gain more weight and accumulate more adipose tissue (subcutaneous, perigonadic, perirenal, brown) than wild type mice, whereas the mass of the other organs is not modified. This is associated with higher plasma leptin and adiponectin [18]. Moreover, adipocytes are larger with no change in their number [18]. Similar changes in fat mass expansion are observed after long-term (6 weeks) treatment of HFD-obese mice with a LPA1/3R-antagonist, Ki16425 [33] (Fig. 1A). Above observations suggest that LPA (via LPA1R) exerts a tonic inhibitory effect on adipose tissue expansion. Such conclusion is in agreement with the anti-adipogenic activity of LPA. Nevertheless, regulation of adipogenesis *in vivo* generally leads to increased adipocyte number (hyperplasia) [34]. However, adipocytes from HFD-fed FATX-KO mice, and Ki16425-treated HFD-mice are not hyperplastic but rather hypertrophic [18], and Fig. 1B and C. Thus, the anti-adipogenic activity of LPA is likely not sufficient to explain the tonic inhibitory effect of LPA on adipose tissue expansion.

Adipocyte hypertrophy reflects a better ability of adipocytes to store triglycerides (lipogenesis), a metabolic event that is tightly dependent on insulin sensitivity. Interestingly, adipose tissue from FATX-KO mice exhibit higher expression of the transcription factor PPAR γ 2 as well as of several of its target genes (adiponectin, FABP4, leptin, glut-1) when compared to wild-type [18]. This is also observed after chronic treatment with Ki16425 (Rancoule and Saulnier-Blache, personal results). Consequently, adipose tissue from FATX-KO mice and Ki16425-treated mice show apparent improvement of its sensitivity to insulin. Thus, the tonic inhibitory effect of LPA on adipose tissue expansion could at least in part be mediated by inhibition insulin sensitivity of adipocytes. Such hypothesis is supported by recent results showing that the refeeding-induction of the insulin-sensitive lipogenic gene fatty acid synthase is stronger in adipose tissue from Ki16425- when compared to control-mice (Fig. 1D).

Beside FATX-KO mice and Ki16425-treated mice, Pamuklar et al. created transgenic mice bearing a liver-specific overexpression of human-ATX using an α 1-antitrypsin promoter [35]. When fed a HFD, these mice display increased body weight and increased brown adipose tissue mass when compared to wild type mice [29]. Whether the mass of the other adipose tissue depots is also altered is not precised by the authors. In parallel, the same group demonstrates that LPA inhibited brown adipocyte differentiation *in vitro* [29]. Intriguingly, the phenotype of these mice is accompanied by a down-regulation of brown adipose tissue-related genes (UCP1, Cidea, PGC1a) in white subcutaneous but not in brown adipose tissue itself [29]. The authors conclude to an inhibition of brown adipocyte differentiation in white adipose depots leading to altered « metabolic efficiency and adiposity in the setting of excessive caloric intake ». Whether such phenotype is due to LPA remains unclear since the over-expression strategy of ATX used in this work leads to a modest increase in plasma LPA [35]. Treatment with a LPA receptor antagonist may help to clarify the question in this model. Alternatively ATX released by the liver could also exert LPA-independent pathways through binding to integrins on the cell surface [1].

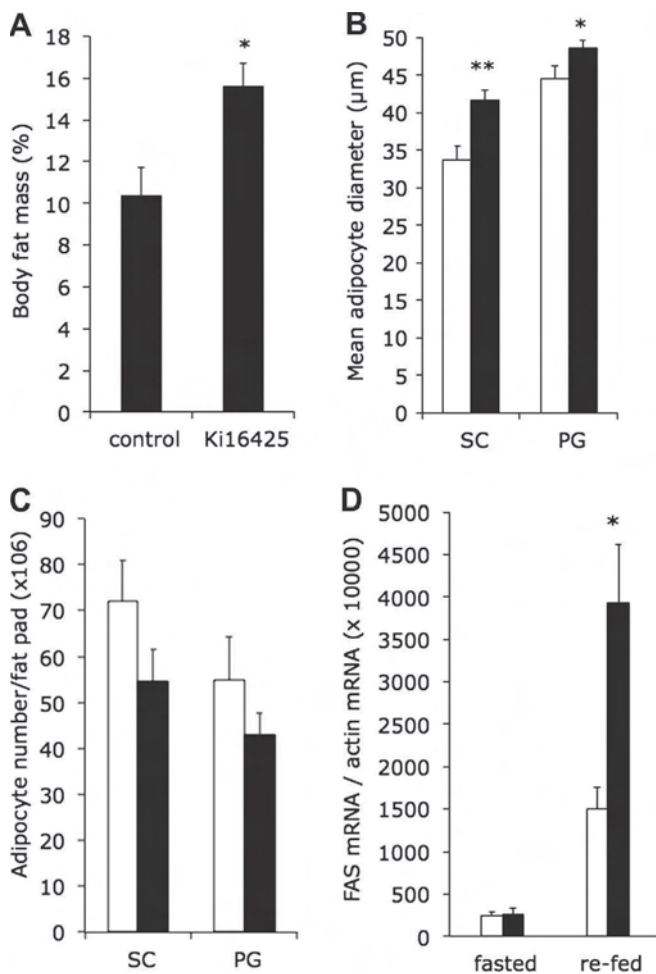


Fig. 1. Chronic blockade of LPA receptor treatment enhances fat mass and adipocyte diameter of obese mice. Nine weeks old C57Bl/6J male mice were made obese by feeding them with a 45% high fat diet (HFD), and were chronically treated with the LPA1/3 receptor antagonist Ki16425 (5 mg/kg/day ip, black bars) or its vehicle (white bars) from the 10th to the 16th week of regime before being sacrificed and analyzed. (A) Body fat mass determined by EchoMRI ($n = 12$ per mice group). Adipocyte size (B) and number (C) were measured after histological analysis of subcutaneous (SC) and perigonadal (PG) adipose tissue slices ($n = 6$ per mice group). (D) Fatty acid synthase (FAS) mRNA expression was measured in perigonadal adipose tissue after an overnight fasting (fasted) ($n = 3$ per mice group) or after overnight fasting followed by 18 h refeeding (refed) ($n = 3$ per mice group). Values are means \pm SEM. Student's t -tests were used for comparison: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

4. ATX/LPA signaling impairs glucose homeostasis

Obesity is often associated with a prediabetic state characterized by alteration in glucose homeostasis (hyperglycemia, impaired glucose tolerance (IGT), hyperinsulinemia, insulin-resistance) that is commonly associated with the metabolic syndrome. Those metabolic changes represent high risk factors for emergence of type 2 diabetes and cardiovascular diseases [36–38]. The mechanisms that predispose obese individual to pre-diabetes and metabolic syndrome remain incompletely defined.

Despite being more sensitive to nutritional obesity, FATX-KO mice fed a HFD show improved glucose tolerance when compared to wild type mice [18]. Similarly, treatment with the LPAR antagonist Ki16425 of obese HFD-fed mice improves their glucose and insulin tolerance. This effect is observed after already 3 weeks treatment with Ki16425, at a time when fat mass is not increased yet [39]. Moreover, in non-obese mice, exogenously injected LPA leads to acute and strong impairment of glucose

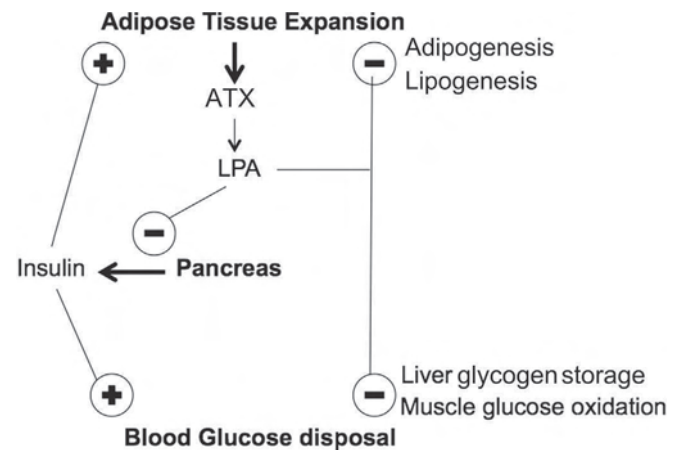


Fig. 2. Schematic view of how adipocyte LPA might regulate adipose tissue expansion and glucose homeostasis.

tolerance associated with inhibition of glucose-induced insulin secretion [39]. These observations strongly suggest that increased ATX-dependent synthesis of LPA with obesity exerts a tonic inhibitory effect on glucose homeostasis likely through inhibition of insulin secretion. In parallel, LPA is able to dose-dependently inhibit glucose-induced insulin secretion by mouse isolated pancreas islets *in vitro* [39]. A direct impact on LPA on pancreatic beta-cells could thus be responsible for its inhibitory influence on glucose-induced insulinemia. Nevertheless, one cannot exclude that the deleterious impact of LPA of glucose homeostasis might also involve a direct action of LPA on other cell types. LPA was reported to increase glucose transport in myocyte and adipose cell lines [40,41] suggesting that the deleterious influence of LPA on *in vivo* glucose homeostasis does not result from its direct impact on skeletal muscle or adipocytes. Nevertheless, LPA was reported to activate glycogenolysis in hepatocytes *in vitro* [42] suggesting that liver might be a possible direct target of the deleterious impact of LPA on glucose homeostasis.

5. Conclusion

Obesity is accompanied by an increased ATX-mediated synthesis of LPA by adipocytes, and LPA exerts tonic local and systemic biological actions through the activation of LPA1 and/or LPA3 receptors (Fig. 2). Locally, LPA negatively influences adipose tissue expansion likely through combined inhibition of adipogenesis and adipocyte lipid storage. Whether the latter effect results from inhibition of *de novo* lipid synthesis and/or an alteration of adipocyte insulin-sensitivity remains to be clarified. In parallel, LPA also exerts a tonic inhibition glucose tolerance resulting, at least in part, from inhibition of insulin secretion. Whether such inhibition is entirely due to a direct action of LPA on pancreas islets and whether a possible regulation of liver glycogen mobilization and/or muscle glucose oxidation remains to be clarified. Beyond that, LPA1 and LPA3 receptors are present in numerous organs. The function of some of these organs such as (heart, vessels, kidney, ...) are known to be altered with obesity. One can thus anticipate that, in addition to obesity-associated impaired glucose tolerance, LPA could participate to other obesity-associated pathologies. In conclusion, ATX and LPA1R represent potential interesting pharmacological targets for the treatment of obesity-associated metabolic diseases.

References

- [1] S. Okudaira, H. Yukiura, J. Aoki, Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin, *Biochimie* 92 (2010) 698–706.

- [2] L.A. van Meeteren, P. Ruurs, C. Stortelers, P. Bouwman, M.A. van Rooijen, J.P. Pradere, T.R. Pettit, M.J. Wakelam, J.S. Saulnier-Blache, C.L. Mummery, W.H. Moolenaar, J. Jonkers, Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 5015–5022.
- [3] M. Tanaka, S. Okudaira, Y. Kishi, R. Ohkawa, S. Iseki, M. Ota, S. Noji, Y. Yatomi, J. Aoki, H. Arai, Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 25822–25830.
- [4] S. Koike, Y. Yutoh, K. Keino-Masu, S. Noji, M. Masu, H. Ohuchi, Autotaxin is required for the cranial neural tube closure and establishment of the midbrain-hindbrain boundary during mouse development, *Dev. Dyn.* 240 (2011) 413–421. Official Publication of the American Association of Anatomists.
- [5] S. Fotopoulou, N. Oikonomou, E. Grigorieva, I. Nikitopoulou, T. Paparountas, A. Thanassopoulou, Z. Zhao, Y. Xu, D.L. Kontoyiannis, E. Remboutsika, V. Aidinis, ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system, *Dev. Biol.* 339 (2010) 451–464.
- [6] M.E. Lin, D.R. Herr, J. Chun, Lysophosphatidic acid (LPA) receptors: signaling properties and disease relevance, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 91 (2010) 130–138.
- [7] J. Chun, T. Hla, K.R. Lynch, S. Spiegel, W.H. Moolenaar, International union of basic and clinical pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor Nomenclature, *Pharmacol. Rev.* 62 (2010) 579–587.
- [8] J.J. Contos, N. Fukushima, J.A. Weiner, D. Kaushal, J. Chun, Requirement for the *lpa1* lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 13384–13389.
- [9] J.W. Choi, D.R. Herr, K. Noguchi, Y.C. Yung, C.W. Lee, T. Mutoh, M.E. Lin, S.T. Teo, K.E. Park, A.N. Mosley, J. Chun, LPA receptors: subtypes and biological actions, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50 (2010) 157–186.
- [10] J.J. Contos, I. Ishii, N. Fukushima, M.A. Kingsbury, X. Ye, S. Kawamura, J.H. Brown, J. Chun, Characterization of *lpa(2)* (*Edg4*) and *lpa(1)/lpa(2)* (*Edg2/Edg4*) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to *lpa(2)*, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 6921–6929.
- [11] X. Ye, K. Hama, J.J. Contos, B. Anliker, A. Inoue, M.K. Skinner, H. Suzuki, T. Amano, G. Kennedy, H. Arai, J. Aoki, J. Chun, LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing, *Nature* 435 (2005) 104–108.
- [12] K. Hama, J. Aoki, A. Inoue, T. Endo, T. Amano, R. Motoki, M. Kanai, X. Ye, J. Chun, N. Matsuki, H. Suzuki, M. Shibasaki, H. Arai, Embryo spacing and implantation timing are differentially regulated by LPA3-mediated lysophosphatidic acid signaling in mice, *Biol. Reprod.* 77 (2007) 954–959.
- [13] Z. Lee, C.T. Cheng, H. Zhang, M.A. Subler, J. Wu, A. Mukherjee, J.J. Windle, C.K. Chen, X. Fang, Role of LPA4/p2y9/GPR23 in negative regulation of cell motility, *Mol. Biol. Cell.* 19 (2008) 5435–5445.
- [14] H. Sumida, K. Noguchi, Y. Kihara, M. Abe, K. Yanagida, F. Hamano, S. Sato, K. Tamaki, Y. Morishita, M.R. Kano, C. Iwata, K. Miyazono, K. Sakimura, T. Shimizu, S. Ishii, LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis, *Blood* (2010).
- [15] M.E. Lin, R.R. Rivera, J. Chun, Targeted deletion of LPA5 identifies novel roles for lysophosphatidic acid signaling in development of neuropathic pain, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 17608–17617.
- [16] S. Gesta, M.F. Simon, A. Rey, D. Sibrac, A. Girard, M. Lafontan, P. Valet, J.S. Saulnier-Blache, Secretion of a lysophospholipase D activity by adipocytes: involvement in lysophosphatidic acid synthesis, *J. Lipid Res.* 43 (2002) 904–910.
- [17] G. Ferry, E. Tellier, A. Try, S. Gres, I. Naime, M.F. Simon, M. Rodriguez, J. Boucher, I. Tack, S. Gesta, P. Chomarat, M. Dieu, M. Raes, J.P. Galizzi, P. Valet, J.A. Boutin, J.S. Saulnier-Blache, Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 18162–18169.
- [18] R. Dusaucy, C. Rancoule, S. Gres, E. Wanecq, A. Colom, C. Guigne, L.A. van Meeteren, W.H. Moolenaar, P. Valet, J.S. Saulnier-Blache, Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid, *J. Lipid Res.* 52 (2011) 1247–1255.
- [19] J. Boucher, D. Quilliot, J.P. Praderes, M.F. Simon, S. Gres, C. Guigne, D. Prevot, G. Ferry, J.A. Boutin, C. Carpenne, P. Valet, J.S. Saulnier-Blache, Potential involvement of adipocyte insulin resistance in obesity-associated up-regulation of adipocyte lysophospholipase D/autotaxin expression, *Diabetologia* 48 (2005) 569–577.
- [20] C. Rancoule, R. Dusaucy, K. Treguer, S. Gres, C. Guigne, D. Quilliot, P. Valet, J.S. Saulnier-Blache, Depot-specific regulation of autotaxin with obesity in human adipose tissue, *J. Physiol. Biochem.* (2012).
- [21] M.F. Simon, D. Daviaud, J.P. Pradere, S. Gres, C. Guigne, M. Wabitsch, J. Chun, P. Valet, J.S. Saulnier-Blache, Lysophosphatidic acid inhibits adipocyte differentiation via lysophosphatidic acid 1 receptor-dependent down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 14656–14662.
- [22] H. Nobusue, D. Kondo, M. Yamamoto, K. Kano, Effects of lysophosphatidic acid on the in vitro proliferation and differentiation of a novel porcine preadipocyte cell line, *Comp. Biochem. Physiol. Part. B Biochem. Mol. Biol.* 157 (2010) 401–407.
- [23] D. Bachner, M. Ahrens, D. Schroder, A. Hoffmann, J. Lauber, N. Betat, P. Steinert, L. Flohe, G. Gross, Bmp-2 downstream targets in mesenchymal development identified by subtractive cloning from recombinant mesenchymal progenitors (C3H10T1/2), *Dev. Dyn.* 213 (1998) 398–411. Official Publication of the American Association of Anatomists.
- [24] H. Sumida, K. Nakamura, K. Yanagida, R. Ohkawa, Y. Asano, T. Kadono, K. Tamaki, K. Igarashi, J. Aoki, S. Sato, S. Ishii, T. Shimizu, Y. Yatomi, Decrease in circulating autotaxin by oral administration of prednisolone, *Clin. Chim. Acta* 415 (2013) 74–80.
- [25] M.F. Simon, A. Rey, I. Castan-Laurel, S. Gres, D. Sibrac, P. Valet, J.S. Saulnier-Blache, Expression of ectolipid phosphate phosphohydrolases in 3T3F442A preadipocytes and adipocytes. Involvement in the control of lysophosphatidic acid production, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 23131–23136.
- [26] C. Pages, D. Daviaud, S. An, S. Krief, M. Lafontan, P. Valet, J.S. Saulnier-Blache, Endothelial differentiation gene-2 receptor is involved in lysophosphatidic acid-dependent control of 3T3F442A preadipocyte proliferation and spreading, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 11599–11605.
- [27] T.E. Holmstrom, C.L. Mattsson, Y. Wang, I. Iakovleva, N. Petrovic, J. Nedergaard, Non-transactivational, dual pathways for LPA-induced Erk1/2 activation in primary cultures of brown pre-adipocytes, *Exp. Cell. Res.* 316 (2010) 2664–2675.
- [28] C.L. Mattsson, E.R. Andersson, J. Nedergaard, Differential involvement of caveolin-1 in brown adipocyte signaling: impaired beta3-adrenergic, but unaffected LPA, PDGF and EGF receptor signaling, *Biochim. Biophys. Acta* 1803 (2010) 983–989.
- [29] L. Federico, H. Ren, P.A. Mueller, T. Wu, S. Liu, J. Popovic, E.M. Blalock, M. Sunkara, H. Ovaa, H.M. Albers, G.B. Mills, A.J. Morris, S.S. Smyth, Autotaxin and its product lysophosphatidic acid suppress brown adipose differentiation and promote diet-induced obesity in mice, *Mol. Endocrinol.* 26 (2012) 786–797.
- [30] M. Noguchi, K. Hosoda, J. Fujikura, M. Fujimoto, H. Iwakura, T. Tomita, T. Ishii, N. Arai, M. Hirata, K. Ebihara, H. Masuzaki, H. Itoh, S. Narumiya, K. Nakao, Genetic and pharmacological inhibition of Rho-associated kinase II enhances adipogenesis, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 29574–29583.
- [31] L. Li, L. Tam, L. Liu, T. Jin, D.S. Ng, Wnt-signaling mediates the anti-adipogenic action of lysophosphatidic acid through cross talking with the Rho/Rho associated kinase (ROCK) pathway, *Biochem. Cell Biol. (Biochimie biologie cellulaire)* 89 (2011) 515–521.
- [32] R. Dusaucy, D. Daviaud, J.P. Pradere, S. Gres, P. Valet, J.S. Saulnier-Blache, Altered food consumption in mice lacking lysophosphatidic acid receptor-1, *J. Physiol. Biochem.* 65 (2009) 345–350.
- [33] H. Ohta, K. Sato, N. Murata, A. Damirin, E. Malchinkhuu, J. Kon, T. Kimura, M. Tobo, Y. Yamazaki, T. Watanabe, M. Yagi, M. Sato, R. Suzuki, H. Murooka, T. Sakai, T. Nishitoba, D.S. Im, H. Nochi, K. Tamoto, H. Tomura, F. Okajima, Ki16425, a subtype-selective antagonist for EDG-family lysophosphatidic acid receptors, *Mol. Pharmacol.* 64 (2003) 994–1005.
- [34] Q.Q. Tang, M.D. Lane, Adipogenesis: from stem cell to adipocyte, *Annu. Rev. Biochem.* 81 (2012) 715–736.
- [35] Z. Pamuklar, L. Federico, S. Liu, M. Umez-Goto, A. Dong, M. Panchatcharam, Z. Fulkerson, E. Berdyshev, V. Natarajan, X. Fang, L.A. van Meeteren, W.H. Moolenaar, G.B. Mills, A.J. Morris, S.S. Smyth, Autotaxin/lysophospholipase D and lysophosphatidic acid regulate murine hemostasis and thrombosis, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 7385–7394.
- [36] M.J. Lee, Y. Wu, S.K. Fried, Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* (2010).
- [37] D.A. Gutierrez, M.J. Puglisi, A.H. Hasty, Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia, *Curr. Diab Rep.* 9 (2009) 26–32.
- [38] S.M. Grundy, Pre-diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular risk, *J. Am. Coll. Cardiol.* 59 (2012) 635–643.
- [39] C. Rancoule, C. Attané, S. Grès, A. Fournel, R. Dusaucy, C. Bertrand, C. Vinel, K. Treguer, M. Prentki, P. Valet, J. Saulnier-Blache, Lysophosphatidic acid impairs glucose homeostasis and inhibits insulin secretion in high fat diet obese mice, *Diabetologia*, in press.
- [40] K. Yea, J. Kim, S. Lim, H.S. Park, K.S. Park, P.G. Suh, S.H. Ryu, Lysophosphatidic acid regulates blood glucose by stimulating myotube and adipocyte glucose uptake, *J. Mol. Med.* 86 (2008) 211–220.
- [41] X. Song, X. Zheng, C.C. Malbon, H. Wang, Galpho i2 enhances in vivo activation of and insulin signaling to GLUT4, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 34651–34658.
- [42] D.S. Im, T. Fujioka, T. Katada, Y. Kondo, M. Ui, F. Okajima, Characterization of sphingosine 1-phosphate-induced actions and its signaling pathways in rat hepatocytes, *Am. J. Physiol.* 272 (1997) G1091–G1099.

II- Article 4

Lysophosphatidic acid-1-receptor targeting agents for fibrosis.

Rancoule C, Pradère JP, Gonzalez J, Klein J, Valet P, Bascands JL, Schanstra JP, Saulnier-Blache JS.

Expert Opin Investig Drugs. 2011 May;20(5):657-67

Expert Opinion

1. Fibrosis
2. Lysophosphatidic acid and its receptors
3. LPA receptor antagonists
4. LPA as a profibrotic mediator
5. Expert opinion and conclusions

Lysophosphatidic acid-1-receptor targeting agents for fibrosis

Chloé Rancoule, Jean-Philippe Pradère, Julien Gonzalez, Julie Klein, Philippe Valet, Jean-Loup Bascands, Joost P Schanstra & Jean-Sébastien Saulnier-Blache[†]

[†]Inserm, U1048/I2MC, Toulouse, France

Introduction: The presence of fibrosis is associated with alterations in organ architecture and is responsible for the morbidity of diseases including pneumopathies, systemic sclerosis, liver cirrhosis, chronic cardiovascular diseases, progressive kidney diseases and diabetes. Although a growing number of pro-fibrotic molecules, mediators and other pathways have been reported, there are currently very few antifibrotic molecules being evaluated in clinical trials.

Areas covered: Current knowledge about the contribution of lysophosphatidic acid (LPA), a bioactive mediator acting via specific G-protein coupled receptors (LPA1R), in the etiology of fibrosis. In a number of organs, fibrosis is associated with increased LPA production as well as with increased expression of some LPA1R subtypes (mainly LPA1R). LPA1R^{-/-} knockout mice and treatment of animal models with specific antagonists clearly demonstrate the contribution of LPA1R subtype to the development of kidney, lung, vascular and dermal fibrosis. The involvement of LPA in liver fibrosis is also strongly suspected but still unproven.

Expert opinion: Experiments in animal models clearly demonstrate that LPA1R antagonists have interesting anti-fibrotic potencies. This reveals promising perspectives for the design of new therapeutic approaches to prevent fibrosis-associated diseases. Nevertheless, the number of efficient LPA1R antagonists currently available is still low, and none of them has been used in clinical trials so far.

Keywords: antagonist, fibrosis, lysophosphatidic acid, receptor

Expert Opin. Investig. Drugs [Early Online]

1. Fibrosis

Fibrosis can be considered as an uncontrolled healing process leading to excessive accumulation of extracellular matrix (ECM). Various stimuli (infections, autoimmune reactions, mechanical injuries, etc.) can lead to tissue damage that generates a repair process leading to the replacement of injured cells. When tissue injury is chronic a sustained production of pro-fibrotic mediators leads to an uncontrolled healing process and the replacement of injured cells by a connective tissue associated with excessive ECM (e.g., fibrosis) remodeling ultimately leading to scar formation [1]. Since it alters the organs' architecture and function, fibrosis is tightly associated and often responsible for the morbidity and mortality (45% of all deaths in the developed world are attributed to some type of chronic fibrosis) of several diseases including pneumopathies, systemic sclerosis, liver cirrhosis, chronic cardiovascular diseases, progressive kidney diseases or diabetes. Fibrosis is also involved in cancer metastasis and chronic graft rejection.

The ontogeny and the functional consequences of fibrosis differ from one tissue to another but the fibrotic process results from a rather universal sequence of events [2]. When a tissue is injured, damaged cells produce pro-inflammatory

informa
healthcare

Article highlights.

- Fibrosis results from a rather universal sequence of events that follow tissue injury: recruitment of pro-inflammatory cells, activation of myofibroblasts and excessive extracellular matrix deposition.
- Lysophosphatidic acid LPA is a growth factor-like mediator acting on G-protein coupled receptors: LPA1 to LPA6 subtypes.
- There are several compounds that exhibit efficient LPA-receptor antagonist properties *in vivo*: Ki16425, VPC-32183, VPC-12249, AM966 and AM095, some of which orally available.
- Gene knockout and pharmacological blockade of the LPA1R subtype significantly attenuate fibrosis in kidney, lung, arteries and skin.

This box summarizes key points contained in the article.

cytokines that initiate platelet activation, fibrin clot formation, increased blood vessel permeability and disruption of basement membrane. These events promote the proliferation and the recruitment of inflammatory cells (neutrophils and macrophages), which eliminate dead cells and produce cytokines and chemokines that amplify the healing response and increase neovascularization around the injury. Inflammatory cells also secrete pro-fibrotic mediators (i.e., IL-13 and TGF- β) leading to the activation of α -smooth-muscle-actin-expressing myofibroblasts that are considered as the master 'producers' of fibrosis. Myofibroblasts migrate into the wound where they promote wound contraction, a process that favors regeneration of the site of injury by new epithelial and/or endothelial cells. Under pathological conditions, when repeated injury occurs, chronic inflammation and repeated wound-healing processes cause excessive accumulation of ECM proteins (collagens, proteoglycans, fibronectin, hyaluronates) that can ultimately lead to scar formation. In fibrosis, most of the excessive ECM deposition is attributed to activated myofibroblasts. Those cells may originate from either resident mesenchymal fibroblasts, or from circulating fibroblast-like cells (fibrocytes) derived from bone marrow stem cells. Myofibroblasts may also originate from epithelial cells through a process called the epithelio-mesenchymal-transition (EMT). The major inducer of myofibroblast activation is TGF- β that acts via a small and mothers against decapentaplegic (SMAD) dependent transduction pathway that can be enhanced by another pro-fibrotic, connective tissue growth factor, or by growth factors (VEGF, IGF-1, angiotensin II, bradikinin, basic fibroblast growth factor (bFGF), lysophosphatidic acid (LPA) etc.).

Fibrosis has obviously a major effect on health but efficient treatments that directly target fibrosis are lacking. This lack of treatment options can be attributed to the fact that animal (rodent) models never fully mimic the clinical situation and that reported antifibrotic effects are often obtained by preventive treatment. In addition, these preventive treatments

are in most of the cases only compared with animals without intervention. The potential antifibrotic abilities of a compound should be tested once tissue fibrosis is already present to better mimic the clinical situation or even better at different stages of the progression of fibrosis.

Although a growing number of molecules, mediators and other pathways have been reported from experimental studies, there are currently very few antifibrotic molecules being evaluated in clinical trials. To the best of our knowledge, only one promising antifibrotic molecule, pirfenidone, has been evaluated in a Phase III trial [3]. Treatment with this molecule decreases ECM accumulation in experimental lung fibrosis [4,5], liver fibrosis [6] and progressive renal fibrosis [7] and even in a streptozotocin-induced cardiac and renal fibrosis model [8]. Although the precise mechanism of action of this compound is unknown, the antifibrotic effect is mainly associated with the inhibition of production and activity of TGF- β . Because of its oral availability as well as the apparent absence of toxicity, this molecule has been tested clinically mainly for idiopathic pulmonary fibrosis [3] and in patients with focal segmental glomerulosclerosis [9]. In both pathologies pirfenidone slowed down disease progression but also showed gastrointestinal adverse events and photosensitive dermatitis in a significant number of patients. Further studies are necessary to evaluate the long-term safety of this compound and its added value in combination with other therapies. Taken together there is still ample space for the development of new antifibrotic drugs/therapies.

2. Lysophosphatidic acid and its receptors

LPA (1-acyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphate) is a growth-factor-like mediator acting on G-protein-coupled receptors (GPCR) that is present in several biological fluids including serum, plasma, ascites and saliva. LPA has been associated with the etiology of a growing number of disorders including cardiovascular diseases (cardiac ischemia, heart hypertrophy, atherosclerosis, cancer, neuropathies, obesity and fibrosis [10,11]). Most fatty acids composing LPAs are long chain saturated (C18:0, C16:0) or unsaturated (C18:1, C20:4) chains linked to the glycerol backbone by acyl- or alkyl-group. Extracellular production of LPA can result from two major pathways: hydrolysis of lysophosphatidylcholine by a soluble lysophospholipase D (autotaxin) and hydrolysis of phosphatidic acid by phospholipase A1 or A2 [12]. In the intracellular compartment LPA can result from the acylation of glycerol-3-phosphate and as such constitutes a crucial step towards triacylglycerol synthesis [13].

The first evidence, to our knowledge, that lysophosphatidic acid (LPA) behaved as a bioactive phospholipid, was obtained by Vogt in 1969 [14] who showed that LPA was responsible for the constricting activity of gut extracts (also called 'Darmstoff') on isolated rabbit duodenum preparations. Since that time, LPA has been demonstrated to elicit a wide range of cell responses (smooth muscle contraction, platelet

aggregation, calcium mobilization, chemotaxis, neurotransmitter release, cell proliferation, cell transformation) [10]. The involvement of a GPCR in LPA action was proposed in the mid-eighties [15-18] and was further confirmed in 1996 by the cloning of the first LPA-receptor, named ventricular zone gene-1 (vzg-1) [19]. Since that discovery, at least five other LPA-receptors have been identified and named LPA1R to LPA6R in accordance with the International Union of Basic and Clinical Pharmacology nomenclature [11]. LPA1R, LPA2R and LPA3R are members of the endothelial differentiation gene family that also encompasses the receptors for sphingosine-1-phosphate, another bioactive lysophospholipid. LPA4R, LPA5R and LPA6R belong to the purinergic GPCR family [20]. LPA1R is the most widely distributed subtypes throughout the organism. In humans, it is particularly abundant in olfactory bulb, retina, spinal cord, adipocytes, smooth muscle and in some brain areas (e.g., hypothalamus and prefrontal cortex). The other LPAR subtypes have a more restricted tissue distribution. An overview of the tissue distribution of the LPAR subtypes can be found at <http://biogps.gnf.org/#goto=welcome>.

Four LPAR subtype gene knockouts (KO) have been reported in mice. LPA1R-KO mice [21] have a reduced perinatal survival and exhibit behavioral and developmental alterations such as reduced body size and alteration of suckling behavior. The loss of LPA1R *in vivo* has also been associated with several diseases including cancer, obesity, neuropathic pain, fibrosis and male infertility [22]. LPA2R-KO mice exhibit no major phenotypic alterations [23], but the double KO LPA2R/LPA1R amplifies some phenotypic alterations observed in LPA1R-KO, suggesting a possible contribution of LPA2R in the development of the nervous system, in male reproduction as well as in cancer and asthma [22]. LPA3R-KO mice exhibit abnormal embryo implantation in the uterus [24,25]. Although LPA4R-KO mice were initially reported to exhibit no major phenotypic alteration [26], a subset of LPA4R-KO embryos with profound alterations in blood and lymphatic vessel formation has recently been reported [27].

3. LPA receptor antagonists

Several LPAR antagonists have been reported [28,29]. They can be classified as lipid molecules mainly derived from LPA or phosphatidic acid (the VPCs, diacylglycerol pyrophosphate (DGPP), a phosphonothionate analogue of carba cyclic phosphatidic acid (thio-ccPA), T14, T15, farnesyl-phosphate) and as non-lipid molecules (Ki16425, AM966, AM095, 5987411 and 5765834, NSC161613 and H2L5186303) (Table 1). Some of these compounds exhibit a relatively high LPAR subtype selectivity: AM966 and AM095 [30,31] are the most selective for LPA1R; DGPP8:0 [32] and Thio-PA8:0 [33] are the most selective for LPA3R. Among those antagonists, some have been used for *in vivo* treatments (Ki16425, VPC-32183, VPC-12249, AM966 and AM095).

3.1 VPC-12249

VPC-12249 ((S)-phosphoric acid mono-[3-(4-benzyloxyphenyl)-2-octadec-9-enoylamino-propyl] ester) is a lipid antagonist derived from N-oleoyl ethanolamide phosphoric acid with a bulky hydrophobic group (benzyl-4-oxybenzyl) substituted at position R₂ [34]. VPC-12249 is commercially available from Avanti Polar Lipids. *In vitro*, VPC-12249 behaves as an LPA1R/LPA3R-antagonist without preference in selectivity towards one of these LPAR-subtypes. The antagonist activity of VPC-12249 *in vivo* has not been firmly established. Nevertheless, long-term treatment of mice with VPC-12249 (1 mg/kg intraperitoneally, three times a week for two months) was shown to significantly attenuate radiation-induced pneumonitis, indicating the involvement of LPA1R/LPA3R in that lung disease [35].

3.2 VPC-32183

VPC-32183 ((S)-phosphoric acid mono-[2-octadec-9-enoylamino-3-[4-(pyridin-2-ylmethoxy)-phenyl]-propyl] ester) is a 2-pyridyl derivative of VPC-12249 (R enantiomer) [36]. VPC-32183 is commercially available from Avanti Polar Lipids. *In vitro*, it behaves as an LPA1R/LPA3R-antagonist without preference in selectivity towards one of these LPAR-subtypes. The only evidence of the antagonist efficiency of VPC-32183 *in vivo* was obtained from experiments in cows, where its intravaginal injection (1 mg) abrogated LPA (1 mg)-induced plasma PGE₂ production [37].

3.3 Ki16425

Ki16425 [3-(4-[4-([1-(2-chlorophenyl)ethoxy]carbonyl amino)-3-methyl-5-isoxazolyl] benzylsulfanyl) propanoic acid] is a non-lipid antagonist that has been synthesized by Kirin Brewery Co. (Takasaki, Japan) [38]. Ki16425 is commercially available from Cayman Chemicals. It is the most widely used antagonist in cell biology research (more than 60 reports in PubMed). It is commonly used to demonstrate the receptor-dependence of a cell response (proliferation, migration, calcium mobilization etc.) activated by LPA. *In vitro*, Ki16425, like VPC-12249 and VPC-32183, behaves as a LPA1R/LPA3R-antagonist without subtype preference. The blocking activity of Ki16425 towards LPA action is reinforced by its ability to inhibit the constitutive activity of the LPAR on its own [39]. It is noticeable that Ki16425 was reported to exhibit partial PPAR-agonist activity at relatively high concentration (10 μ M) [40] suggesting that some LPAR-independent actions of Ki16425 cannot be ruled out.

Several reports show that LPAR-antagonist properties of Ki16425 are conserved *in vivo*. Acute treatment (30 min) with Ki16425 (intravenous 0.5 mg/kg) blocks LPA-mediated reduction of organ injury associated with endotoxemia in rats [41]. Co-injection of Ki16425 (1 μ g) with LPA 18:1 (1 μ g) into the aorta abdominalis of cows potently reduced the increase in plasma progesterone and PGE₂ generated by injection of LPA [42]. Intraperitoneal injection of Ki16425 (30 mg/kg) completely blocked neuropathic pain-like

Table 1. Relative affinity of some LPAR antagonists.

Name	Inhibition of LPA-mediated response (IC ₅₀ nM)					Cell response
	LPA1R	LPA2R	LPA3R	LPA4R	LPA5R	
Non-lipidic						
AM966 [30]	17	1700	1600	7700	8600	Calcium mobilization
AM095 [31]	17		34000			Calcium mobilization
Compound 20 [120]	94		752		463	Calcium mobilization
5765834 [121]	94		752		463	Calcium mobilization
Ki16425 [38]	340	6500	930			Inositol phosphate production
5987411 [121]				1400	3500	Calcium mobilization
NSC161613 [122]			24			Calcium mobilization
H2L5186303 [122]	27354	9	1230			Calcium mobilization
Lipidic						
VPC-32183 [36]	109		175			GTPγS binding
VPC-12249 [34]	5210		6450			GTPγS binding
Thiophosphatidic acid 8:0 8b [123]	686		11			Calcium mobilization
Dialkyl thiophosphatidic acid 8:0 13b [123]	328		184			Calcium mobilization
Bromomethylene phosphonate [124]	750	304	380	167		Calcium mobilization
Diocetyl glycerol pyrophosphate [32]	3000		250			Calcium mobilization
Farnesyl diphosphate [125]		2100	155	1980		Calcium mobilization

behaviors generated by intrathecal injection of LPA in mice [43]. Ki16425 has also been used for longer treatment periods (2 weeks) with potent antagonist action. For example, daily subcutaneous injection of Ki16425 (20 mg/kg) for 16 days in nude mice bearing breast cancer tumors overexpressing LPA1-R, inhibited 90% of the osteolytic lesions resulting from metastasis of breast cancer cells [44].

3.4 AM966 and AM095

AM966 [(4'-{4-[(R)-1-(2-chloro-phenyl)-ethoxycarbonylamino]-3-methyl-isoxazol-5-yl}-biphenyl-4-yl)-acetic acid] and AM095; {4'-[3-methyl-4-((R)-1-phenyl-ethoxycarbonylamino)-isoxazol-5-yl]-biphenyl-4-yl}-acetate are non-lipid antagonists synthesized by Amira Pharmaceuticals, San Diego [30,31,45]. Both exhibit a higher selectivity towards LPA1R when compared with the LPA3R subtypes (9-fold for AM066, 200-fold for AM095) as assessed by its ability to inhibit LPA-induced calcium release or GTPγS binding in LPAR-expressing CHO-cells. It is important to point out that AM966 and AM095 are the only available LPAR antagonists that can be administrated orally with a good pharmacokinetic profile: when administrated in rats at the dose of 10 mg/kg, plasma concentration of the antagonists peaked within 1 (AM966) or 2 h (AM095) to μM concentration (9 μM for AM966, 41 μM for AM095) and decreased to 10 nM over a 24 h period. Whereas the antagonist activity of AM966 and AM095 *in vivo* have not firmly been established, chronic oral gavage (7 – 8 days) of mice at doses from 10 to 30 mg/kg/day significantly attenuates bleomycin induced pulmonary fibrosis or renal tubulo-interstitial fibrosis induced by ureteral obstruction in mice [30,31].

4. LPA as a profibrotic mediator

4.1 Renal fibrosis

Renal fibrosis is the principal process involved in the progression of chronic kidney disease (CKD) to end-stage renal disease (ESRD). Several factors promoting renal fibrosis exist, including intrarenal hypertension and hyperfiltration, oxidative stress, angiotensin II, leptin, inflammatory cytokines, hyperinsulinemia/insulin resistance, hyperglycemia/diabetes and impaired lipid metabolism [46]. The development of renal fibrosis involves the progressive appearance of glomerulosclerosis, tubulointerstitial fibrosis and changes in renal vasculature (loss of glomerular and peritubular capillaries) causing a steady decline in renal function ultimately leading to end stage organ failure. The multitude of events and factors involved in the development of renal fibrosis is reflected by the increasing number of experimental reports showing the potential anti-fibrotic effect of a number of strategies and compounds. However, the only currently clinically available drugs that have been shown to slow down the progression towards ESRD are the inhibitors of the renin-angiotensin system (RAS). Unfortunately, even when treated with RAS inhibitors CKD continues to progress. Alternative molecules or therapies are thus necessary [47,48]. Recent work from our laboratory has shown potential antifibrotic properties in renal fibrosis for a number of molecules including LPA1 receptor [49] and kinin B1 receptor antagonist [50,51]. The work on the LPA1 receptor antagonist and renal fibrosis are detailed below.

The unilateral ureteral obstruction (UUO) of the kidney in rodents is a common model that rapidly (over 5 – 6 days)

reproduces the different steps of tubulo-interstitial fibrosis including renal inflammation, fibroblast activation and accumulation of extracellular matrix in the tubulointerstitium [52]. UUO-induced renal fibrosis in mice is associated with a significant increase in LPA1 receptor expression while the expression of the three other LPA receptors remained stable. This was paralleled by renal LPA production (3.3-fold increase) in conditioned media from kidney explants [49]. That increase is attenuated when UUO is associated with injection of bone marrow mononuclear cells [53]. A significant increase (sixfold) in renal expression of LPA1R was also observed in mice treated with a nephrotoxic serum [54], another model of renal fibrosis that is characterized by a rapid progressive glomerulonephritis followed by the slow appearance of tubulo-interstitial fibrosis (over 6 weeks) [55]. The causal involvement of LPA in kidney fibrosis was demonstrated by showing that UUO-mediated renal fibrosis was significantly attenuated in LPA1R-KO mice compared with wild type mice [49]. In addition, treatment with the LPAR antagonist Ki16425 (20 mg/kg/day subcutaneously) starting one day before UUO and maintained over 5 days, strongly attenuated renal fibrosis [49]. Similar anti-fibrotic activity has recently been obtained with the highly LPA1R-selective antagonist AM095 [31] confirming the important contribution of LPA1R to the mediation of the pro-fibrotic activity of LPA in kidney.

4.2 Pulmonary fibrosis

Pulmonary fibrosis is characterized by the presence of an excess of fibrous tissue (also called 'scarring of the lung') that progressively replaces the normal lung parenchyma. It may be a secondary effect of interstitial aggressions (autoimmune disorders, infections, exposition to medications or pollutants, radiation) or appear without any known cause (idiopathic pulmonary fibrosis) often linked to genetic predispositions [56,57]. A commonly used experimental model for pulmonary fibrosis is treatment of rodents with bleomycin. Such treatment does not completely reproduce human pulmonary fibrosis but is relatively rapid, with lung fibrosis appearing after 1 or 2 weeks after bleomycin administration [58].

Tager *et al.*, have shown that LPA is an important contributor to pulmonary fibrosis [59]. LPA was detected in bronchoalveolar lavage fluid and its concentration is significantly increased in bleomycin-challenged mice. Genetic ablation of the LPA1 receptor (LPA1-KO mice) reduced bleomycin-induced pulmonary fibrosis and increased animal survival. Complementary studies further demonstrated that profibrotic effects of LPA1 receptor stimulation might be explained by LPA1-receptor-mediated vascular leakage and increased fibroblast recruitment, which are two major profibrotic events. More recently, Swaney *et al.* [30,31] showed that 7 days treatment with the selective LPA1R antagonists, AM966 or AM095 (10 mg/kg/day, oral gavage), led to similar protective effect against bleomycin-induced lung fibrosis, observed in

LPA1R-KO mice. Finally, LPA and the LPA1R may also play an important role in human pulmonary fibrosis as it was shown that the LPA1R was the LPAR most highly expressed on fibroblasts obtained from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Furthermore, bronchoalveolar lavage fluid obtained from idiopathic pulmonary fibrosis patients induced chemotaxis of human foetal lung fibroblasts that was blocked by the LPA1R antagonist Ki16425 [59]. Interestingly, LPA has recently been found to be involved in radiation pneumonitis, which is characterized at least in part by the development of lung fibrosis [35]. In that report, it was shown that irradiation increased LPA1R and LPA3R expression and LPA levels in the lungs and that pharmacological treatment with the LPA receptor antagonist, VPC-12249 (1 mg/kg intraperitoneally, three times a week for two months), significantly reduced the induction of some fibrotic markers by radiation including TGF- β 1, connective tissue growth factor (CTGF), and α -smooth muscle actin (α -SMA) expression.

4.3 Arterial fibrosis (intimal hyperplasia)

The remodeling and hypertrophy of the vascular wall that follows arterial injury is a critical component in the development of atherosclerotic and restenotic lesions. It is characterized by an excessive neointima formation resulting from the hyperplasia of dedifferentiated smooth muscle cells (SMC) into contractile and ECM-producing cells resembling myofibroblasts [60]. *In vitro*, LPA is able to dedifferentiate SMCs [61,62]. *In vivo*, LPA was reported to play an important role in oxidized low-density lipoprotein (oxLDL)-mediated neointima formation [63]. Carotid injury in normal mice leads to an increased expression of LPAR (1, 2 and 4) associated with an increased expression of the LPA-producing enzyme autotaxin, and the neointima formation is strongly attenuated in double LPA1-2R KO mice [64]. In atherogenic sensitive apoE^{-/-} mice, vascular injury leads to an upregulation of LPA2R and LPA4R associated with a reduced LPA1R expression, and treatment with Ki16425 (5 mg/kg/day for 4 weeks) strongly attenuated spontaneous and LPA-mediated neointima formation [65].

4.4 Systemic sclerosis

Systemic sclerosis, or scleroderma, is an autoimmune disease characterized by vasculopathy, autoimmunity and extensive fibrosis. There are two major forms of systemic sclerosis: limited and diffuse. Several organs are affected by systemic sclerosis including skin, skeletal muscle, joints, lungs, kidneys and the gastrointestinal tract [66]. The LPA concentration is increased in plasma and serum samples from systemic scleroderma patients [67,68], which may result from an increased level of platelet activation associated with the pathogenesis of systemic sclerosis [69]. An experimental model of scleroderma in rodents consists in repeated subcutaneous injections of bleomycin. Such treatment leads to dermal thickening and fibrosis that resembles scleroderma [70]. Bleomycin-induced

skin fibrosis (dermal thickening, collagen content, presence of myofibroblasts) was found to be strongly attenuated in LPA1R-KO mice whereas no change was observed in LPA2R-KO mice [45]. Bleomycin-induced dermal fibrosis was also strongly reduced in wild type mice treated with the selective LPA1R-antagonist AM095 [45]. Consequently, LPA activation of the LPA1R clearly contributes to bleomycin-induced skin fibrosis. Further investigations have now to be conducted to determine whether LPA1R could be an interesting target for treating human scleroderma.

4.5 Liver fibrosis

Liver fibrosis is one of the main characteristics of liver cirrhosis, a disease most commonly caused by alcoholism, hepatitis B and C, and fatty liver disease. The hallmark of liver fibrosis is the development of scar tissue that replaces normal parenchyma, blocking the portal blood flow, disturbing normal liver function, with a possible evolution towards hepatocellular carcinoma. One of the pivotal cell types of liver fibrosis is the stellate cells, that normally store vitamin A, but can also be activated into contractile myofibroblasts that obstruct blood flow and secrete the pro-fibrotic mediator TGF- β and ECM [71,72].

Several *in vitro* studies have shown that LPA can activate hepatic myofibroblasts [73] and increase the proliferation and survival of stellate cells [74,75]. Correlations have been established between plasma LPA concentration and the histological stages of liver fibrosis markers in patients with chronic hepatitis C [76], as well as in rats treated with a chemically induced fibrosis [77]. Interestingly, an overexpression of the LPA-producing enzyme autotaxin as well as of proteins involved in LPA signaling such as the Rho GTPase binding proteins (Cdc42s), has been reported in liver biopsies from patients with cancer versus hepatitis patients or normal patients [78]. The above reports indicate a probable involvement of LPA in liver fibrosis with possible consequences for the development of hepatocellular carcinoma.

4.6 Pathways involved in pro-fibrotic action of LPA

Fibrosis can be considered to be an uncontrolled healing process leading to excessive accumulation of ECM. Several years before the demonstration of the profibrotic action of LPA, several reports mention its positive effect on the healing process. This was particularly obvious in cutaneous wounds where topical application of LPA accelerate re-epithelialization of the ear skin after excision [79-82]. Accelerated wound healing by LPA has also been observed in injured colon following 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid administration [83]. The pro-healing activity of LPA is attributed to a combined effect on fibroblast proliferation and migration as well as to a chemotactic activity towards macrophages, several events in wound healing. Consequently, the pro-fibrotic action of LPA could result from a deregulation of its pro-healing activity. Evidence for the possible direct action of LPA on fibrosis *in vitro* comes from experiments showing its ability

to enhance the transdifferentiation process of fibroblast-like cells into α -SMA-expressing myofibroblast. This transdifferentiation was shown in mesenchymal stem cells [84,85] as well as in dental pulp cells [86], trabecular meshwork cells [87], and neuronal progenitor cells [88]. In addition, LPA induces the expression and activation of the ClC-3 chloride channel that is required for fibroblast-to-myofibroblast differentiation during wound healing [89]. The possible pathway involved in the pro-fibrotic action of LPA is its capacity to increase the expression of CTGF [90]. This was observed in mesangial cells [91,92], endothelial cells [93], gingival cells [94], trabecular meshwork [95], epithelial cells [96], skeletal muscle cells [97], renal interstitial cells [49], keloid fibroblasts [98]. This involves the Rho-rhokinase (ROCK) pathway [91,99], the integrin-linked kinase [100], and may require transactivation of TGF- β -receptors as well as JNK pathway activation [101]. Finally, the pro-fibrotic action of LPA is reinforced by its capacity to activate cell contraction and fibronectin assembly [102-105] which are two important events involved in the wound-healing process.

5. Expert opinion and conclusions

Several kinds of evidence indicate an important role for LPA in the etiology of fibrosis. The profibrotic action of LPA has clearly been established in kidney, lung and arteries with two main characteristics: i) the existence of a positive correlation between the apparition of fibrosis markers and the increased production of LPA associated with an increased expression of the LPA1R; ii) the attenuation of fibrosis in LPA1R^{-/-} mice or by treatment with LPA1R antagonists.

One can anticipate that the concept of the profibrotic action of LPA could be extended to other organs such as liver where correlations have been established between plasma LPA concentrations and the fibrosis index [76,77]. Moreover, a possible involvement of LPA in other fibrosis-associated diseases such in gingival fibromatosis, skin scar formation, muscular dystrophies, glaucoma and bacteria-mediated intestinal fibrosis has also been proposed [86,87,94,96-98,106].

Fibrosis is recognized as a pathogenic complication of numerous diseases including diabetes and obesity [107]. In such affection, fibrosis affects several organs including kidney, liver, heart or the adipose tissue, and its intensity is negatively correlated with the degree of insulin-sensitivity [108-112]. Our group has shown an overproduction of LPA in kidney and adipose tissue from insulin-resistant obese individuals resulting from an over-expression of the LPA-producing enzyme autotaxin [113,114]. Moreover, we observed a positive correlation between LPA1R expression and fibrosis markers in kidney and adipose tissue from obese/diabetic individuals (unpublished data). We propose that LPA and LPA1R may play a role in obesity-associated fibrosis.

There is an important core of literature showing a strong connection between fibrosis and cancer progression that is

partly explained by the tight relationship between ECM synthesis and/or stiffening, and tumor growth [115,116]. LPA is known to be involved in tumor progression and invasion [117,118] partly because of its action in ECM remodeling [119]. Thus, it is tempting to suggest that a part of LPA's oncogenic properties may be mediated by its profibrotic functions.

The capacity of LPA1R antagonists to reduce the extent of fibrosis in kidney and lung open up an interesting pharmacological perspective for the treatment of fibrosis-associated diseases. Despite a growing number of LPAR antagonists that exhibit potent LPAR subtype selectivity, few of them have been validated for *in vivo* treatments in animals. The recently developed antagonists AM966 and AM095 [30,31,45] are certainly the most promising compounds today: they are non-lipidic molecules exhibiting potent LPA1R selectivity and can be administered orally with interesting pharmacokinetic properties. These antagonists certainly

constitute a starting point for a drug design program to develop more efficient anti-fibrotic drugs that may have important clinical applications in the management of the prevention and/or treatment of end-stage organ failure associated with fibrosis.

Declaration of interest

The work of C Rancoule and JS Saulnier-Blache was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), and by the Fondation de la Recherche Médicale (France) (grant #DRM20101220459). The work of JL Bascands and JP Schanstra was supported by INSERM, the 'Direction Régionale Clinique' (Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Toulouse, France) under the Interface program and by an Agence Nationale de la Recherche (ANR) grant (ANR-07-PHYSIO-004-01).

Bibliography

- Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008;214:199-210
- Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 2007;117:524-9
- Maher TM. Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *Drugs Today (Barc)* 2010;46:473-82
- Iyer SN, Wild JS, Schiedt MJ, et al. Dietary intake of pirfenidone ameliorates bleomycin-induced lung fibrosis in hamsters. *J Lab Clin Med* 1995;125:779-85
- Iyer SN, Gurujeyalakshmi G, Giri SN. Effects of pirfenidone on transforming growth factor-beta gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291:367-73
- Zhao XY, Zeng X, Li XM, et al. Pirfenidone inhibits carbon tetrachloride- and albumin complex-induced liver fibrosis in rodents by preventing activation of hepatic stellate cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009;36:963-8
- Shimizu T, Fukagawa M, Kuroda T, et al. Pirfenidone prevents collagen accumulation in the remnant kidney in rats with partial nephrectomy. *Kidney Int Suppl* 1997;63:S239-43
- Miric G, Dallemagne C, Endre Z, et al. Reversal of cardiac and renal fibrosis by pirfenidone and spironolactone in streptozotocin-diabetic rats. *Br J Pharmacol* 2001;133:687-94
- Cho ME, Smith DC, Branton MH, et al. Pirfenidone slows renal function decline in patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2:906-13
- Lin ME, Herr DR, Chun J. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors: signaling properties and disease relevance. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2010;91:130-8
- Chun J, Hla T, Lynch KR, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid Receptor Nomenclature. *Pharmacol Rev* 2010;62:579-87
- Aoki J, Inoue A, Okudaira S. Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochim Biophys Acta* 2008;1781:513-18
- Pages C, Simon MF, Valet P, Saulnier-Blache JS. Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2001;64:1-10
- Vogt W. Pharmacologically active acidic phospholipids and glycolipids. *Biochem Pharmacol* 1963;12:415-20
- Proll MA, Clark RB, Butcher RW. Phosphatidate and monooleylphosphatidate inhibition of fibroblast adenylate cyclase is mediated by the inhibitory coupling protein, Ni. *Mol Pharmacol* 1985;28:331-7
- Jalink K, van Corven EJ, Moolenaar WH. Lysophosphatidic acid, but not phosphatidic acid, is a potent Ca²⁺-mobilizing stimulus for fibroblasts. Evidence for an extracellular site of action. *J Biol Chem* 1990;265:12232-9
- van Corven EJ, Groenink A, Jalink K, et al. Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell* 1989;59:45-54
- van der Bend RL, Brunner J, Jalink K, et al. Identification of a putative membrane receptor for the bioactive phospholipid, lysophosphatidic acid. *Embo J* 1992;11:2495-501
- Hecht JH, Weiner JA, Post SR, Chun J. Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J Cell Biol* 1996;135:1071-83
- Noguchi K, Herr D, Mutoh T, Chun J. Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:15-23
- Contos JJ, Fukushima N, Weiner JA, et al. Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13384-9
- Choi JW, Herr DR, Noguchi K, et al. LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010;50:157-86

Lysophosphatidic acid-1-receptor targeting agents for fibrosis

23. Contos JJ, Ishii I, Fukushima N, et al. Characterization of lpa2 (Edg4) and lpa1/lpa2 (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to lpa2. *Mol Cell Biol* 2002;22:6921-9
24. Ye X, Hama K, Contos JJ, et al. LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature* 2005;435:104-8
25. Hama K, Aoki J, Inoue A, et al. Embryo spacing and implantation timing are differentially regulated by LPA3-mediated lysophosphatidic acid signaling in mice. *Biol Reprod* 2007;77:954-9
26. Lee Z, Cheng CT, Zhang H, et al. Role of LPA4/p2y9/GPR23 in negative regulation of cell motility. *Mol Biol Cell* 2008;19:5435-45
27. Sumida H, Noguchi K, Kihara Y, et al. LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood* 2010;116:5060-70
28. Tigyi G. Aiming drug discovery at lysophosphatidic acid targets. *Br J Pharmacol* 2010;161:241-70
29. Im DS. Pharmacological tools for lysophospholipid GPCRs: development of agonists and antagonists for LPA and S1P receptors. *Acta Pharmacol Sin* 2010;31:1213-22
30. Swaney JS, Chapman C, Correa LD, et al. A novel, orally active LPA1 receptor antagonist inhibits lung fibrosis in the mouse bleomycin model. *Br J Pharmacol* 2010;160:1699-713
31. Swaney JS, Chapman C, Correa LD, et al. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Characterization of an Oral, LPA1-selective Antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; published online 15 December 2010, doi: 10.1124/jpet.110.175901
32. Fischer DJ, Nusser N, Virag T, et al. Short-chain phosphatidates are subtype-selective antagonists of lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol* 2001;60:776-84
33. Prestwich GD, Gajewiak J, Zhang H, et al. Phosphatase-resistant analogues of lysophosphatidic acid: agonists promote healing, antagonists and autotaxin inhibitors treat cancer. *Biochim Biophys Acta* 2008;1781:588-94
34. Heise CE, Santos WL, Schreihöfer AM, et al. Activity of 2-substituted lysophosphatidic acid (LPA) analogs at LPA receptors: discovery of a LPA1/LPA3 receptor antagonist. *Mol Pharmacol* 2001;60:1173-80
35. Xue J, Gan L, Li X, et al. Effects of lysophosphatidic acid and its receptors LPA(1/3) on radiation pneumonitis. *Oncol Rep* 2010;24:1515-20
36. Heasley BH, Jarosz R, Lynch KR, Macdonald TL. Initial structure-activity relationships of lysophosphatidic acid receptor antagonists: discovery of a high-affinity LPA1/LPA3 receptor antagonist. *Bioorg Med Chem Lett* 2004;14:2735-40
37. Woclawek-Potocka I, Kowalczyk-Zieba I, Skarzynski DJ. Lysophosphatidic acid action during early pregnancy in the cow: in vivo and in vitro studies. *J Reprod Dev* 2010;56:411-20
38. Ohta H, Sato K, Murata N, et al. Ki16425, a subtype-selective antagonist for EDG-family lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol* 2003;64:994-1005
39. Moughal NA, Waters CM, Valentine WJ, et al. Protean agonism of the lysophosphatidic acid receptor-1 with Ki16425 reduces nerve growth factor-induced neurite outgrowth in pheochromocytoma 12 cells. *J Neurochem* 2006;98:1920-9
40. Durgam GG, Virag T, Walker MD, et al. Synthesis, structure-activity relationships, and biological evaluation of fatty alcohol phosphates as lysophosphatidic acid receptor ligands, activators of PPARgamma, and inhibitors of autotaxin. *J Med Chem* 2005;48:4919-30
41. Murch O, Collin M, Thiemermann C. Lysophosphatidic acid reduces the organ injury caused by endotoxemia-a role for G-protein-coupled receptors and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Shock* 2007;27:48-54
42. Woclawek-Potocka I, Komiyama J, Saulnier-Blache JS, et al. Lysophosphatic acid modulates prostaglandin secretion in the bovine uterus. *Reproduction* 2009;137:95-105
43. Ma L, Matsumoto M, Xie W, et al. Evidence for lysophosphatidic acid 1 receptor signaling in the early phase of neuropathic pain mechanisms in experiments using Ki-16425, a lysophosphatidic acid 1 receptor antagonist. *J Neurochem* 2009;109:603-10
44. Boucharaba A, Serre CM, Guglielmi J, et al. The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:9643-8
45. Castellino FV, Seiders J, Bain G, et al. Genetic deletion or pharmacologic antagonism of LPA1 ameliorates dermal fibrosis in a scleroderma mouse model. *Arthritis Rheum* 2011; published online 28 January 2011. doi: 10.1002/art.30262
46. Ting SM, Nair H, Ching I, et al. Overweight, obesity and chronic kidney disease. *Nephron Clin Pract* 2009;112:c121-c127; discussion c27
47. Boor P, Sebekova K, Ostendorf T, Floege J. Treatment targets in renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:3391-407
48. Iwano M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004;13:279-84
49. Pradere JP, Klein J, Gres S, et al. LPA1 receptor activation promotes renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:3110-18
50. Klein J, Gonzalez J, Decramer S, et al. Blockade of the kinin B1 receptor ameliorates glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:1157-64
51. Klein J, Gonzalez J, Duchene J, et al. Delayed blockade of the kinin B1 receptor reduces renal inflammation and fibrosis in obstructive nephropathy. *Faseb J* 2009;23:134-42
52. Bascands JL, Schanstra JP. Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. *Kidney Int* 2005;68:925-37
53. Verdoorn KS, Lindoso RS, Lowe J, et al. Bone marrow mononuclear cells shift bioactive lipid pattern in injured kidney towards tissue repair in rats with unilateral ureteral obstruction. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25:3867-74
54. Pradere JP, Gonzalez J, Klein J, et al. Lysophosphatidic acid and renal fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 2008;1781:582-7
55. Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME, et al. RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and

- interstitial fibrosis. *J Exp Med* 1997;185:1371-80
56. Strieter RM, Mehrad B. New mechanisms of pulmonary fibrosis. *Chest* 2009;136:1364-70
57. Gomer RH, Lupher ML Jr. Investigational approaches to therapies for idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs* 2010;19:737-45
58. Chua F, Gauldie J, Laurent GJ. Pulmonary fibrosis: searching for model answers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33:9-13
59. Tager AM, LaCamera P, Shea BS, et al. The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med* 2008;14:45-54
60. Mitra AK, Agrawal DK. Gene therapy of fibroproliferative vasculopathies: current ideas in molecular mechanisms and biomedical technology. *Pharmacogenomics* 2006;7:1185-98
61. Hayashi K, Takahashi M, Nishida W, et al. Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acids. *Circ Res* 2001;89:251-8
62. Komachi M, Damirin A, Malchinkhuu E, et al. Signaling pathways involved in DNA synthesis and migration in response to lysophosphatidic acid and low-density lipoprotein in coronary artery smooth muscle cells. *Vascul Pharmacol* 2009;50:178-84
63. Zhang C, Baker DL, Yasuda S, et al. Lysophosphatidic acid induces neointima formation through PPARGgamma activation. *J Exp Med* 2004;199:763-74
64. Panchatcharam M, Miriyala S, Yang F, et al. Lysophosphatidic acid receptors 1 and 2 play roles in regulation of vascular injury responses but not blood pressure. *Circ Res* 2008;103:662-70
65. Subramanian P, Karshovska E, Reinhard P, et al. Lysophosphatidic acid receptors LPA1 and LPA3 promote CXCL12-mediated smooth muscle progenitor cell recruitment in neointima formation. *Circ Res* 2010;107:96-105
66. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007;117:557-67
67. Tokumura A, Carbone LD, Yoshioka Y, et al. Elevated serum levels of arachidonoyl-lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate in systemic sclerosis. *Int J Med Sci* 2009;6:168-76
68. Pattanaik D, Postlethwaite AE. A role for lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Discov Med* 2010;10:161-7
69. Postlethwaite AE, Chiang TM. Platelet contributions to the pathogenesis of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2007;19:574-9
70. Wu M, Varga J. In perspective: murine models of scleroderma. *Curr Rheumatol Rep* 2008;10:173-82
71. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2011;6:425-56
72. Wallace K, Burt AD, Wright MC. Liver fibrosis. *Biochem J* 2008;411:1-18
73. Tangkijvanich P, Melton AC, Chitapanarux T, et al. Platelet-derived growth factor-BB and lysophosphatidic acid distinctly regulate hepatic myofibroblast migration through focal adhesion kinase. *Exp Cell Res* 2002;281:140-7
74. Ikeda H, Yatomi Y, Yanase M, et al. Effects of lysophosphatidic acid on proliferation of stellate cells and hepatocytes in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;248:436-40
75. Ikeda H, Nagashima K, Yanase M, et al. Involvement of Rho/Rho kinase pathway in regulation of apoptosis in rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G880-6
76. Watanabe N, Ikeda H, Nakamura K, et al. Both plasma lysophosphatidic acid and serum autotaxin levels are increased in chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol* 2007;41:616-23
77. Watanabe N, Ikeda H, Nakamura K, et al. Plasma lysophosphatidic acid level and serum autotaxin activity are increased in liver injury in rats in relation to its severity. *Life Sci* 2007;81:1009-15
78. Cooper AB, Wu J, Lu D, Maluccio MA. Is autotaxin (ENPP2) the link between hepatitis C and hepatocellular cancer? *J Gastrointest Surg* 2007;11:1628-34; discussion 1634-1635
79. Liliom K, Guan Z, Tseng JL, et al. Growth factor-like phospholipids generated after corneal injury. *Am J Physiol* 1998;274:C1065-74
80. Demoyer JS, Skalak TC, Durieux ME. Lysophosphatidic acid enhances healing of acute cutaneous wounds in the mouse. *Wound Repair Regen* 2000;8:530-7
81. Balazs L, Okolicany J, Ferrebee M, et al. Topical application of the phospholipid growth factor lysophosphatidic acid promotes wound healing in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;280:R466-72
82. Wang J, Carbone LD, Watsky MA. Receptor-mediated activation of a Cl⁻ current by LPA and S1P in cultured corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(10):3202-8
83. Sturm A, Sudermann T, Schulte KM, et al. Modulation of intestinal epithelial wound healing in vitro and in vivo by lysophosphatidic acid. *Gastroenterology* 1999;117:368-77
84. Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, et al. Cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates differentiation of human mesenchymal stem cells to myofibroblast-like cells. *Stem Cells* 2008;26:789-97
85. Jeon ES, Lee IH, Heo SC, et al. Mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis in a murine xenograft model of A549 human adenocarcinoma through an LPA1 receptor-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:1205-13
86. Cheng R, Cheng L, Shao MY, et al. Roles of lysophosphatidic acid and the Rho-associated kinase pathway in the migration of dental pulp cells. *Exp Cell Res* 2010;316:1019-27
87. Pattabiraman PP, Rao PV. Mechanistic basis of Rho GTPase-induced extracellular matrix synthesis in trabecular meshwork cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;298:C749-63
88. Morishita R, Nagata K, Ito H, et al. Expression of smooth muscle cell-specific proteins in neural progenitor cells induced by agonists of G protein-coupled receptors and transforming growth factor-beta. *J Neurochem* 2007;101:1031-40
89. Yin Z, Tong Y, Zhu H, Watsky MA. ClC-3 is required for LPA-activated Cl⁻ current activity and fibroblast-to-myofibroblast differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;294:C535-42

90. de Winter P, Leoni P, Abraham D. Connective tissue growth factor: structure-function relationships of a mosaic, multifunctional protein. *Growth Factors* 2008;26:80-91
91. Hahn A, Heusinger-Ribeiro J, Lanz T, et al. Induction of connective tissue growth factor by activation of heptahelical receptors. Modulation by Rho proteins and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 2000;275:37429-35
92. Heusinger-Ribeiro J, Eberlein M, Wahab NA, Goppelt-Strube M. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibroblasts: regulatory roles of RhoA and cAMP. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1853-61
93. Muehlich S, Schneider N, Hinkmann F, et al. Induction of connective tissue growth factor (CTGF) in human endothelial cells by lysophosphatidic acid, sphingosine-1-phosphate, and platelets. *Atherosclerosis* 2004;175:261-8
94. Kantarci A, Black SA, Xydias CE, et al. Epithelial and connective tissue cell CTGF/CCN2 expression in gingival fibrosis. *J Pathol* 2006;210:59-66
95. Chudgar SM, Deng P, Maddala R, et al. Regulation of connective tissue growth factor expression in the aqueous humor outflow pathway. *Mol Vis* 2006;12:1117-26
96. Wiedmaier N, Muller S, Koberle M, et al. Bacteria induce CTGF and CYR61 expression in epithelial cells in a lysophosphatidic acid receptor-dependent manner. *Int J Med Microbiol* 2008;298:231-43
97. Vial C, Zuniga LM, Cabello-Verrugio C, et al. Skeletal muscle cells express the profibrotic cytokine connective tissue growth factor (CTGF/CCN2), which induces their dedifferentiation. *J Cell Physiol* 2008;215:410-21
98. Lopes LB, Furnish EJ, Komalavilas P, et al. Cell permeant peptide analogues of the small heat shock protein, HSP20, reduce TGF-beta1-induced CTGF expression in keloid fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2009;129:590-8
99. Kita T, Hata Y, Kano K, et al. Transforming growth factor-beta2 and connective tissue growth factor in proliferative vitreoretinal diseases: possible involvement of hyalocytes and therapeutic potential of Rho kinase inhibitor. *Diabetes* 2007;56:231-8
100. Graness A, Giehl K, Goppelt-Strube M. Differential involvement of the integrin-linked kinase (ILK) in RhoA-dependent rearrangement of F-actin fibers and induction of connective tissue growth factor (CTGF). *Cell Signal* 2006;18:433-40
101. Cabello-Verrugio C, Cordova G, Vial C, et al. Connective tissue growth factor induction by lysophosphatidic acid requires transactivation of transforming growth factor type beta receptors and the JNK pathway. *Cell Signal* 2011;23:449-57
102. Mio T, Liu X, Toews ML, Rennard SI. Lysophosphatidic acid augments fibroblast-mediated contraction of released collagen gels. *J Lab Clin Med* 2002;139:20-7
103. Valenick LV, Schwarzbauer JE. Ligand density and integrin repertoire regulate cellular response to LPA. *Matrix Biol* 2006;25:223-31
104. Parizi M, Howard EW, Tomasek JJ. Regulation of LPA-promoted myofibroblast contraction: role of Rho, myosin light chain kinase, and myosin light chain phosphatase. *Exp Cell Res* 2000;254:210-20
105. Zhang Q, Checovich WJ, Peters DM, et al. Modulation of cell surface fibronectin assembly sites by lysophosphatidic acid. *J Cell Biol* 1994;127:1447-59
106. Yin Z, Carbone LD, Gotoh M, et al. Lysophosphatidic acid-activated Cl⁻ current activity in human systemic sclerosis skin fibroblasts. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:2290-7
107. Ban CR, Twigg SM. Fibrosis in diabetes complications: pathogenic mechanisms and circulating and urinary markers. *Vasc Health Risk Manag* 2008;4:575-96
108. Sagar E, Nakagawa T, Ono-Kishino M, et al. SMP-534 ameliorates progression of glomerular fibrosis and urinary albumin in diabetic db/db mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:F813-20
109. Gutkowska J, Broderick TL, Bogdan D, et al. Downregulation of oxytocin and natriuretic peptides in diabetes: possible implications in cardiomyopathy. *J Physiol* 2009;587:4725-36
110. Sahai A, Malladi P, Pan X, et al. Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G1035-43
111. Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, et al. Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes* 2010;59:2817-25
112. Henegar C, Tordjman J, Achard V, et al. Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol* 2008;9:R14
113. Ferry G, Tellier E, Try A, et al. Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J Biol Chem* 2003;278:18162-9
114. Boucher J, Quilliot D, Praderes JP, et al. Potential involvement of adipocyte insulin resistance in obesity-associated up-regulation of adipocyte lysophospholipase D/autotaxin expression. *Diabetologia* 2005;48:569-77
115. Butcher DT, Alliston T, Weaver VM. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2009;9:108-22
116. Levental KR, Yu H, Kass L, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 2009;139:891-906
117. Mills GB, Moolenaar WH. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:582-91
118. Peyruchaud O. Novel implications for lysophospholipids, lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate, as drug targets in cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 2009;9:381-91
119. Park SY, Jeong KJ, Panupinthu N, et al. Lysophosphatidic acid augments human hepatocellular carcinoma cell invasion through LPA1 receptor and MMP-9 expression. *Oncogene* 2010; published online 22 November 2010, doi:10.1038/onc.2010.517
120. Fells JI, Tsukahara R, Liu J, et al. Structure-based drug design identifies novel LPA3 antagonists. *Bioorg Med Chem* 2009;17:7457-64
121. Williams JR, Khandoga AL, Goyal P, et al. Unique ligand selectivity of the GPR92/LPA5 lysophosphatidate receptor indicates role in human platelet

- activation. *J Biol Chem* 2009;284:17304-19
122. Fells JI, Tsukahara R, Fujiwara Y, et al. Identification of non-lipid LPA3 antagonists by virtual screening. *Bioorg Med Chem* 2008;16:6207-17
 123. Durgam GG, Tsukahara R, Makarova N, et al. Synthesis and pharmacological evaluation of second-generation phosphatidic acid derivatives as lysophosphatidic acid receptor ligands. *Bioorg Med Chem Lett* 2006;16:633-40
 124. Jiang G, Xu Y, Fujiwara Y, et al. alpha-substituted phosphonate analogues of lysophosphatidic acid (LPA) selectively inhibit production and action of LPA. *ChemMedChem* 2007;2:679-90
 125. Liliom K, Tsukahara T, Tsukahara R, et al. Farnesyl phosphates are endogenous ligands of lysophosphatidic acid receptors: inhibition of LPA GPCR and activation of PPARs. *Biochim Biophys Acta* 2006;1761:1506-14

Affiliation

Chloé Rancoule^{1,2}, Jean-Philippe Pradère³,
 Julien Gonzalez^{1,2}, Julie Klein^{1,2},
 Philippe Valet^{1,2}, Jean-Loup Bascands^{1,2},
 Joost P Schanstra^{1,2} &
 Jean-Sébastien Saulnier-Blache^{†1,2}

[†]Author for correspondence

¹Inserm, U1048/I2MC,
 1 avenue Jean Poulhès, BP 84225,
 31432 Toulouse Cedex 4, France
 E-mail: Jean-Sebastien.Saulnier-Blache@inserm.fr

²Université Toulouse III Paul Sabatier,
 Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil,
 Toulouse, F-31000 France

³Columbia University,
 College of Physicians and Surgeons,
 Department of Medicine,
 NY 10032, USA

Références bibliographiques

1. Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shulman GI, Kahn BB (2001) Adipose-selective targeting of the glut4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409:729-733

2. Abu El-Asrar AM, Mohammad G, Nawaz MI, Siddiquei MM, Kangave D, Opdenakker G (2013) Expression of lysophosphatidic acid, autotaxin and acylglycerol kinase as biomarkers in diabetic retinopathy. *Acta diabetologica* 50:363-371

3. Achike FI, To NH, Wang H, Kwan CY (2011) Obesity, metabolic syndrome, adipocytes and vascular function: A holistic viewpoint. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 38:1-10

4. Adams JM, Difazio LT, Rolandelli RH, Lujan JJ, Hasko G, Csoka B, Selmechy Z, Nemeth ZH (2009) Hif-1: A key mediator in hypoxia. *Acta physiologica Hungarica* 96:19-28

5. Adapala VJ, Adedokun SA, Considine RV, Ajuwon KM (2012) Acute inflammation plays a limited role in the regulation of adipose tissue col1a1 protein abundance. *The Journal of nutritional biochemistry* 23:567-572

6. Aguilar-Bryan L, Bryan J (1999) Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocrine reviews* 20:101-135

7. Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF (2002) Phosphorylation of ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *The Journal of biological chemistry* 277:1531-1537

8. Ahn JI, Lee KH, Shin DM, Shim JW, Kim CM, Kim H, Lee SH, Lee YS (2004) Temporal expression changes during differentiation of neural stem cells derived from mouse embryonic stem cell. *Journal of cellular biochemistry* 93:563-578

9. Ainslie K, Shi ZD, Garanich JS, Tarbell JM (2004) Rat aortic smooth muscle cells contract in response to serum and its components in a calcium independent manner. *Annals of biomedical engineering* 32:1667-1675

10. Akinnusi ME, Saliba R, Porhomayon J, El-Solh AA (2012) Sleep disorders in morbid obesity. *European journal of internal medicine* 23:219-226

11. Albers HM, Dong A, van Meeteren LA, Egan DA, Sunkara M, van Tilburg EW, Schuurman K, van Tellingen O, Morris AJ, Smyth SS, Moolenaar WH, Ovaa H (2010) Boronic acid-based inhibitor of

autotaxin reveals rapid turnover of lpa in the circulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:7257-7262

12. Alessi MC, Bastelica D, Morange P, Berthet B, Leduc I, Verdier M, Geel O, Juhan-Vague I (2000) Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta1, and bmi are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. *Diabetes* 49:1374-1380

13. Alessi MC, Poggi M, Juhan-Vague I (2007) Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance. *Current opinion in lipidology* 18:240-245

14. Alligier M, Meugnier E, Debard C, Lambert-Porcheron S, Chanseane E, Sothier M, Loizon E, Hssain AA, Brozek J, Scoazec JY, Morio B, Vidal H, Laville M (2012) Subcutaneous adipose tissue remodeling during the initial phase of weight gain induced by overfeeding in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97:E183-192

15. Annuzzi G, Piscitelli F, Di Marino L, Patti L, Giacco R, Costabile G, Bozzetto L, Riccardi G, Verde R, Petrosino S, Rivellese AA, Di Marzo V (2010) Differential alterations of the concentrations of endocannabinoids and related lipids in the subcutaneous adipose tissue of obese diabetic patients. *Lipids in health and disease* 9:43

16. Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Ryden M, Frisen J, Bernard S, Arner P (2010) Adipocyte turnover: Relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes* 59:105-109

17. Ashcroft FM, Rorsman P (2012) Diabetes mellitus and the beta cell: The last ten years. *Cell* 148:1160-1171

18. Awada R, Rondeau P, Gres S, Saulnier-Blache JS, Lefebvre d'Hellencourt C, Bourdon E (2012) Autotaxin protects microglial cells against oxidative stress. *Free radical biology & medicine* 52:516-526

19. Balazs L, Okolicany J, Ferrebee M, Tolley B, Tigyi G (2001) Topical application of the phospholipid growth factor lysophosphatidic acid promotes wound healing in vivo. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 280:R466-472

20. Ballard FJ (1972) Effects of fasting and refeeding on the concentrations of glycolytic intermediates and the regulation of lipogenesis in rat adipose tissue in vivo. *Biochimica et biophysica acta* 273:110-118

21. Barbayianni E, Magrioti V, Moutevelis-Minakakis P, Kokotos G (2013) Autotaxin inhibitors: A patent review. *Expert opinion on therapeutic patents*

22. Bastelica D, Morange P, Berthet B, Borghi H, Lacroix O, Grino M, Juhan-Vague I, Alessi MC (2002) Stromal cells are the main plasminogen activator inhibitor-1-producing cells in human fat: Evidence of differences between visceral and subcutaneous deposits. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22:173-178

23. Bays H, Abate N, Chandalia M (2005) Adiposopathy: Sick fat causes high blood sugar, high blood pressure and dyslipidemia. *Future cardiology* 1:39-59
24. Bays HE, Gonzalez-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi AE, Bergman DA, Schorr AB, Rodbard HW, Henry RR (2008) Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert review of cardiovascular therapy* 6:343-368
25. Bays HE, LaFerrere B, Dixon J, Aronne L, Gonzalez-Campoy JM, Apovian C, Wolfe BM, Adiposopathy, Bariatric Surgery Working G (2009) Adiposopathy and bariatric surgery: Is 'sick fat' a surgical disease? *International journal of clinical practice* 63:1285-1300
26. Becton LJ, Shatat IF, Flynn JT (2012) Hypertension and obesity: Epidemiology, mechanisms and clinical approach. *Indian journal of pediatrics* 79:1056-1061
27. Bektas M, Payne SG, Liu H, Goparaju S, Milstien S, Spiegel S (2005) A novel acylglycerol kinase that produces lysophosphatidic acid modulates cross talk with egfr in prostate cancer cells. *The Journal of cell biology* 169:801-811
28. Bello V, Goding JW, Greengrass V, Sali A, Dubljevic V, Lenoir C, Trugnan G, Maurice M (2001) Characterization of a di-leucine-based signal in the cytoplasmic tail of the nucleotide-pyrophosphatase npp1 that mediates basolateral targeting but not endocytosis. *Molecular biology of the cell* 12:3004-3015
29. Berdichevets IN, Tyazhelova TV, Shimshilashvili Kh R, Rogaev EI (2010) Lysophosphatidic acid is a lipid mediator with wide range of biological activities. Biosynthetic pathways and mechanism of action. *Biochemistry Biokhimiia* 75:1088-1097
30. Bhargava P, Lee CH (2012) Role and function of macrophages in the metabolic syndrome. *The Biochemical journal* 442:253-262
31. Black EJ, Clair T, Delrow J, Neiman P, Gillespie DA (2004) Microarray analysis identifies autotaxin, a tumour cell motility and angiogenic factor with lysophospholipase d activity, as a specific target of cell transformation by v-jun. *Oncogene* 23:2357-2366
32. Blackburn J, Mansell JP (2012) The emerging role of lysophosphatidic acid (lpa) in skeletal biology. *Bone* 50:756-762
33. Bluher M (2010) The distinction of metabolically 'healthy' from 'unhealthy' obese individuals. *Current opinion in lipidology* 21:38-43
34. Boden G (2008) Obesity and free fatty acids. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 37:635-646, viii-ix

35. Boucharaba A, Serre CM, Guglielmi J, Bordet JC, Clezardin P, Peyruchaud O (2006) The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:9643-9648

36. Boucher I, Yu W, Beaudry S, Negoro H, Tran M, Pollak MR, Henderson JM, Denker BM (2012) Galpha12 activation in podocytes leads to cumulative changes in glomerular collagen expression, proteinuria and glomerulosclerosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 92:662-675

37. Boucher J, Quilliot D, Praderes JP, Simon MF, Gres S, Guigne C, Prevot D, Ferry G, Boutin JA, Carpenne C, Valet P, Saulnier-Blache JS (2005) Potential involvement of adipocyte insulin resistance in obesity-associated up-regulation of adipocyte lysophospholipase d/autotaxin expression. *Diabetologia* 48:569-577

38. Bouloumie A, Sengenès C, Portolan G, Galitzky J, Lafontan M (2001) Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: Involvement in adipose differentiation. *Diabetes* 50:2080-2086

39. Brakenhielm E, Cao R, Gao B, Angelin B, Cannon B, Parini P, Cao Y (2004) Angiogenesis inhibitor, tnp-470, prevents diet-induced and genetic obesity in mice. *Circulation research* 94:1579-1588

40. Brindley DN, English D, Pilquill C, Buri K, Ling ZC (2002) Lipid phosphate phosphatases regulate signal transduction through glycerolipids and sphingolipids. *Biochimica et biophysica acta* 1582:33-44

41. Brixel LR, Monteilh-Zoller MK, Ingenbrandt CS, Fleig A, Penner R, Enklaar T, Zabel BU, Prawitt D (2010) Trpm5 regulates glucose-stimulated insulin secretion. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 460:69-76

42. Budnik LT, Mukhopadhyay AK (2002) Lysophosphatidic acid and its role in reproduction. *Biology of reproduction* 66:859-865

43. Burdon KP, Lehtinen AB, Langefeld CD, Carr JJ, Rich SS, Freedman BI, Herrington D, Bowden DW (2008) Genetic analysis of the soluble epoxide hydrolase gene, ephx2, in subclinical cardiovascular disease in the diabetes heart study. *Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease* 5:128-134

44. Burke JE, Dennis EA (2009) Phospholipase a2 structure/function, mechanism, and signaling. *Journal of lipid research* 50 Suppl:S237-242

45. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC (2003) Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:102-110

46. Butler AE, Janson J, Soeller WC, Butler PC (2003) Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: Evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid. *Diabetes* 52:2304-2314

47. Canello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot JL, Bouloumie A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson PA, Barsh GS, Zucker JD, Basdevant A, Langin D, Clement K (2005) Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 54:2277-2286

48. Cao H, Gerhold K, Mayers JR, Wiest MM, Watkins SM, Hotamisligil GS (2008) Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* 134:933-944

49. Cao Y (2007) Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *The Journal of clinical investigation* 117:2362-2368

50. Cao Y (2010) Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Nature reviews Drug discovery* 9:107-115

51. Carmeliet P (2005) Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438:932-936

52. Carvalho E, Kotani K, Peroni OD, Kahn BB (2005) Adipose-specific overexpression of glut4 reverses insulin resistance and diabetes in mice lacking glut4 selectively in muscle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 289:E551-561

53. Case D, Irwin D, Ivester C, Harral J, Morris K, Imamura M, Roedersheimer M, Patterson A, Carr M, Hagen M, Saavedra M, Crossno J, Jr., Young KA, Dempsey EC, Poirier F, West J, Majka S (2007) Mice deficient in galectin-1 exhibit attenuated physiological responses to chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 292:L154-164

54. Castellino FV, Seiders J, Bain G, Brooks SF, King CD, Swaney JS, Lorrain DS, Chun J, Luster AD, Tager AM (2011) Amelioration of dermal fibrosis by genetic deletion or pharmacologic antagonism of lysophosphatidic acid receptor 1 in a mouse model of scleroderma. *Arthritis and rheumatism* 63:1405-1415

55. Castellino FV (2012) Lipids and eicosanoids in fibrosis: Emerging targets for therapy. *Current opinion in rheumatology* 24:649-655

56. Castilla-Ortega E, Sanchez-Lopez J, Hoyo-Becerra C, Matas-Rico E, Zambrana-Infantes E, Chun J, De Fonseca FR, Pedraza C, Estivill-Torres G, Santin LJ (2010) Exploratory, anxiety and spatial memory impairments are dissociated in mice lacking the lpa1 receptor. *Neurobiology of learning and memory* 94:73-82

57. Chan SL, Mourtada M, Morgan NG (2001) Characterization of a katp channel-independent pathway involved in potentiation of insulin secretion by efaroxan. *Diabetes* 50:340-347
58. Chapman HA, Riese RJ, Shi GP (1997) Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annual review of physiology* 59:63-88
59. Chavey C, Mari B, Monthouel MN, Bonnafous S, Anglard P, Van Obberghen E, Tartare-Deckert S (2003) Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation. *The Journal of biological chemistry* 278:11888-11896
60. Chen J, Baydoun AR, Xu R, Deng L, Liu X, Zhu W, Shi L, Cong X, Hu S, Chen X (2008) Lysophosphatidic acid protects mesenchymal stem cells against hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis. *Stem cells* 26:135-145
61. Chen M, O'Connor KL (2005) Integrin alpha6beta4 promotes expression of autotaxin/enpp2 autocrine motility factor in breast carcinoma cells. *Oncogene* 24:5125-5130
62. Chiellini C, Costa M, Novelli SE, Amri EZ, Benzi L, Bertacca A, Cohen P, Del Prato S, Friedman JM, Maffei M (2003) Identification of cathepsin k as a novel marker of adiposity in white adipose tissue. *Journal of cellular physiology* 195:309-321
63. Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee CW, Mutoh T, Lin ME, Teo ST, Park KE, Mosley AN, Chun J (2010) Lpa receptors: Subtypes and biological actions. *Annual review of pharmacology and toxicology* 50:157-186
64. Chua SC, Jr., Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L, Leibel RL (1996) Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the ob (leptin) receptor. *Science* 271:994-996
65. Chun J, Hla T, Lynch KR, Spiegel S, Moolenaar WH (2010) International union of basic and clinical pharmacology. Lxxviii. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacological reviews* 62:579-587
66. Chun TH, Hotary KB, Sabeh F, Saltiel AR, Allen ED, Weiss SJ (2006) A pericellular collagenase directs the 3-dimensional development of white adipose tissue. *Cell* 125:577-591
67. Chun YS, Yeo EJ, Choi E, Teng CM, Bae JM, Kim MS, Park JW (2001) Inhibitory effect of yc-1 on the hypoxic induction of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in hep3b cells. *Biochemical pharmacology* 61:947-954
68. Chun YS, Yeo EJ, Park JW (2004) Versatile pharmacological actions of yc-1: Anti-platelet to anticancer. *Cancer letters* 207:1-7

69. Clair T, Aoki J, Koh E, Bandle RW, Nam SW, Ptaszynska MM, Mills GB, Schiffmann E, Liotta LA, Stracke ML (2003) Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate. *Cancer research* 63:5446-5453
70. Clement K, Langin D (2007) Regulation of inflammation-related genes in human adipose tissue. *Journal of internal medicine* 262:422-430
71. Cohen DH, LeRoith D (2012) Obesity, type 2 diabetes, and cancer: The insulin and igf connection. *Endocrine-related cancer* 19:F27-45
72. Coleman RA, Lee DP (2004) Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Progress in lipid research* 43:134-176
73. Contos JJ, Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Chun J (2000) Requirement for the Ipa1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:13384-13389
74. Contos JJ, Ishii I, Chun J (2000) Lysophosphatidic acid receptors. *Molecular pharmacology* 58:1188-1196
75. Contos JJ, Ishii I, Fukushima N, Kingsbury MA, Ye X, Kawamura S, Brown JH, Chun J (2002) Characterization of Ipa(2) (edg4) and Ipa(1)/Ipa(2) (edg2/edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: Signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to Ipa(2). *Molecular and cellular biology* 22:6921-6929
76. Cremers B, Flesch M, Kostenis E, Maack C, Niedernberg A, Stoff A, Sudkamp M, Wendler O, Bohm M (2003) Modulation of myocardial contractility by lysophosphatidic acid (Ipa). *Journal of molecular and cellular cardiology* 35:71-80
77. Cusi K (2012) Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: Pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology* 142:711-725 e716
78. Davenport AP, Alexander SP, Sharman JL, Pawson AJ, Benson HE, Monaghan AE, Liew WC, Mpamhanga CP, Bonner TI, Neubig RR, Pin JP, Spedding M, Harmar AJ (2013) International union of basic and clinical pharmacology. Lxxxviii. G protein-coupled receptor list: Recommendations for new pairings with cognate ligands. *Pharmacological reviews* 65:967-986
79. de Meijer VE, Sverdlow DY, Le HD, Popov Y, Puder M (2012) Tissue-specific differences in inflammatory infiltrate and matrix metalloproteinase expression in adipose tissue and liver of mice with diet-induced obesity. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 42:601-610

80. De Vos A, Heimberg H, Quartier E, Huypens P, Bouwens L, Pipeleers D, Schuit F (1995) Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *The Journal of clinical investigation* 96:2489-2495

81. Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, Masini M, Bugliani M, Sbrana S, Torri S, Pollera M, Boggi U, Mosca F, Del Prato S, Marchetti P (2005) Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes* 54:727-735

82. Del Guerra S, Grupillo M, Masini M, Lupi R, Bugliani M, Torri S, Boggi U, Del Chiaro M, Vistoli F, Mosca F, Del Prato S, Marchetti P (2007) Gliclazide protects human islet beta-cells from apoptosis induced by intermittent high glucose. *Diabetes/metabolism research and reviews* 23:234-238

83. Derosa G, Ferrari I, D'Angelo A, Tinelli C, Salvadeo SA, Ciccarelli L, Piccinni MN, Gravina A, Ramondetti F, Maffioli P, Cicero AF (2008) Matrix metalloproteinase-2 and -9 levels in obese patients. *Endothelium : journal of endothelial cell research* 15:219-224

84. Derosa G, Maffioli P (2012) Anti-obesity drugs: A review about their effects and their safety. *Expert opinion on drug safety* 11:459-471

85. Despres JP, Lemieux I (2006) Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444:881-887

86. Diraison F, Yankah V, Letexier D, Dusserre E, Jones P, Beylot M (2003) Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans. *Journal of lipid research* 44:846-853

87. Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, Basdevant A, Guerre-Millo M, Poitou C, Zucker JD, Bedossa P, Clement K (2010) Fibrosis in human adipose tissue: Composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes* 59:2817-2825

88. Divoux A, Clement K (2011) Architecture and the extracellular matrix: The still unappreciated components of the adipose tissue. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 12:e494-503

89. Donath MY, Shoelson SE (2011) Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature reviews Immunology* 11:98-107

90. Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, Ballantyne CM, Couper D, Vigo A, Hoogeveen R, Folsom AR, Heiss G, Atherosclerosis Risk in Communities S (2003) Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: The atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes* 52:1799-1805

91. Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, Pietka T, Abumrad NA, Patterson BW, Okunade A, Klein S (2009) Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:15430-15435

92. Fain JN, Leffler CW, Bahouth SW (2000) Eicosanoids as endogenous regulators of leptin release and lipolysis by mouse adipose tissue in primary culture. *Journal of lipid research* 41:1689-1694

93. Fain JN, Leffler CW, Bahouth SW, Rice AM, Rivkees SA (2000) Regulation of leptin release and lipolysis by pge2 in rat adipose tissue. *Prostaglandins & other lipid mediators* 62:343-350

94. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW (2004) Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145:2273-2282

95. Falcao-Pires I, Castro-Chaves P, Miranda-Silva D, Lourenco AP, Leite-Moreira AF (2012) Physiological, pathological and potential therapeutic roles of adipokines. *Drug discovery today* 17:880-889

96. Fan H, Zingarelli B, Harris V, Tempel GE, Halushka PV, Cook JA (2008) Lysophosphatidic acid inhibits bacterial endotoxin-induced pro-inflammatory response: Potential anti-inflammatory signaling pathways. *Molecular medicine* 14:422-428

97. Fandrey J, Gassmann M (2009) Oxygen sensing and the activation of the hypoxia inducible factor 1 (hif-1)--invited article. *Advances in experimental medicine and biology* 648:197-206

98. Fang X, Schummer M, Mao M, Yu S, Tabassam FH, Swaby R, Hasegawa Y, Tanyi JL, LaPushin R, Eder A, Jaffe R, Erickson J, Mills GB (2002) Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1582:257-264

99. Faust IM, Johnson PR, Stern JS, Hirsch J (1978) Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: A new model of obesity. *The American journal of physiology* 235:E279-286

100. Federico L, Ren H, Mueller PA, Wu T, Liu S, Popovic J, Blalock EM, Sunkara M, Ovaa H, Albers HM, Mills GB, Morris AJ, Smyth SS (2012) Autotaxin and its product lysophosphatidic acid suppress brown adipose differentiation and promote diet-induced obesity in mice. *Molecular endocrinology* 26:786-797

101. Ferry G, Tellier E, Try A, Gres S, Naime I, Simon MF, Rodriguez M, Boucher J, Tack I, Gesta S, Chomarar P, Dieu M, Raes M, Galizzi JP, Valet P, Boutin JA, Saulnier-Blache JS (2003) Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *The Journal of biological chemistry* 278:18162-18169

102. Ferry G, Giganti A, Coge F, Bertaux F, Thiam K, Boutin JA (2007) Functional invalidation of the autotaxin gene by a single amino acid mutation in mouse is lethal. *FEBS letters* 581:3572-3578

103. Ferry G, Moulharat N, Pradere JP, Desos P, Try A, Genton A, Giganti A, Beucher-Gaudin M, Lonchampt M, Bertrand M, Saulnier-Blache JS, Tucker GC, Cordi A, Boutin JA (2008) S32826, a nanomolar inhibitor of autotaxin: Discovery, synthesis and applications as a pharmacological tool. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 327:809-819

104. Flamment M, Hajduch E, Ferre P, Fougelle F (2012) New insights into er stress-induced insulin resistance. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 23:381-390

105. Flegal KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI (2013) Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: A systematic review and meta-analysis. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 309:71-82

106. Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB (2003) Years of life lost due to obesity. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 289:187-193

107. Fotopoulou S, Oikonomou N, Grigorieva E, Nikitopoulou I, Paparountas T, Thanassopoulou A, Zhao Z, Xu Y, Kontoyiannis DL, Remboutsika E, Aidinis V (2010) Atx expression and lpa signalling are vital for the development of the nervous system. *Developmental biology* 339:451-464

108. Fourcade O, Simon MF, Viode C, Rugani N, Leballe F, Ragab A, Fournie B, Sarda L, Chap H (1995) Secretory phospholipase a2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* 80:919-927

109. Frayn KN (2002) Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia* 45:1201-1210

110. Frisca F, Sabbadini RA, Goldshmit Y, Pebay A (2012) Biological effects of lysophosphatidic acid in the nervous system. *International review of cell and molecular biology* 296:273-322

111. Frisca F, Crombie DE, Dottori M, Goldshmit Y, Pebay A (2013) Rho/rock pathway is essential to the expansion, differentiation, and morphological rearrangements of human neural stem/progenitor cells induced by lysophosphatidic acid. *Journal of lipid research* 54:1192-1206

112. Fujioka S, Matsuzawa Y, Tokunaga K, Tarui S (1987) Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism: clinical and experimental* 36:54-59

113. Fukushima N (2004) Lpa in neural cell development. *Journal of cellular biochemistry* 92:993-1003

114. Funicello M, Novelli M, Ragni M, Vottari T, Cocuzza C, Soriano-Lopez J, Chiellini C, Boschi F, Marzola P, Masiello P, Saftig P, Santini F, St-Jacques R, Desmarais S, Morin N, Mancini J, Percival MD, Pinchera A, Maffei M (2007) Cathepsin k null mice show reduced adiposity during the rapid accumulation of fat stores. *PloS one* 2:e683
115. Funke M, Zhao Z, Xu Y, Chun J, Tager AM (2012) The lysophosphatidic acid receptor lpa1 promotes epithelial cell apoptosis after lung injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 46:355-364
116. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation* 114:1752-1761
117. Gagnon A, Yarmo MN, Landry A, Sorisky A (2012) Macrophages alter the differentiation-dependent decreases in fibronectin and collagen i/iii protein levels in human preadipocytes. *Lipids* 47:873-880
118. Gagnon AM, Chabot J, Pardasani D, Sorisky A (1998) Extracellular matrix induced by tgfbeta impairs insulin signal transduction in 3t3-l1 preadipose cells. *Journal of cellular physiology* 175:370-378
119. Galton DJ (1968) Lipogenesis in human adipose tissue. *Journal of lipid research* 9:19-26
120. Gan L, Xue JX, Li X, Liu DS, Ge Y, Ni PY, Deng L, Lu Y, Jiang W (2011) Blockade of lysophosphatidic acid receptors lpar1/3 ameliorates lung fibrosis induced by irradiation. *Biochemical and biophysical research communications* 409:7-13
121. Gan X, Wang J, Wang C, Sommer E, Kozasa T, Srinivasula S, Alessi D, Offermanns S, Simon MI, Wu D (2012) Prr5l degradation promotes mtorc2-mediated pkc-delta phosphorylation and cell migration downstream of galpha12. *Nature cell biology* 14:686-696
122. Gao Z, Zhang X, Zuberi A, Hwang D, Quon MJ, Lefevre M, Ye J (2004) Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3t3-l1 adipocytes. *Molecular endocrinology* 18:2024-2034
123. Garber AJ (2012) Obesity and type 2 diabetes: Which patients are at risk? *Diabetes, obesity & metabolism* 14:399-408
124. Geng H, Lan R, Singha PK, Gilchrist A, Weinreb PH, Violette SM, Weinberg JM, Saikumar P, Venkatachalam MA (2012) Lysophosphatidic acid increases proximal tubule cell secretion of profibrotic cytokines pdgf-b and ctgf through lpa2- and galphaq-mediated rho and alphavbeta6 integrin-dependent activation of tgfbeta. *The American journal of pathology* 181:1236-1249

125. Gesta S, Simon MF, Rey A, Sibrac D, Girard A, Lafontan M, Valet P, Saulnier-Blache JS (2002) Secretion of a lysophospholipase d activity by adipocytes: Involvement in lysophosphatidic acid synthesis. *Journal of lipid research* 43:904-910

126. Gierse J, Thorarensen A, Beltey K, Bradshaw-Pierce E, Cortes-Burgos L, Hall T, Johnston A, Murphy M, Nemirovskiy O, Ogawa S, Pegg L, Pelc M, Prinsen M, Schnute M, Wendling J, Wene S, Weinberg R, Wittwer A, Zweifel B, Masferrer J (2010) A novel autotaxin inhibitor reduces lysophosphatidic acid levels in plasma and the site of inflammation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 334:310-317

127. Giganti A, Rodriguez M, Fould B, Moulharat N, Coge F, Chomarat P, Galizzi JP, Valet P, Saulnier-Blache JS, Boutin JA, Ferry G (2008) Murine and human autotaxin alpha, beta, and gamma isoforms: Gene organization, tissue distribution, and biochemical characterization. *The Journal of biological chemistry* 283:7776-7789

128. Gilon P, Shepherd RM, Henquin JC (1993) Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic ca^{2+} as evidences in single pancreatic islets. *The Journal of biological chemistry* 268:22265-22268

129. Goetzl EJ, Dolezalova H, Kong Y, Hu YL, Jaffe RB, Kalli KR, Conover CA (1999) Distinctive expression and functions of the type 4 endothelial differentiation gene-encoded g protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid in ovarian cancer. *Cancer research* 59:5370-5375

130. Goetzl EJ, Kong Y, Voice JK (2000) Cutting edge: Differential constitutive expression of functional receptors for lysophosphatidic acid by human blood lymphocytes. *Journal of immunology* 164:4996-4999

131. Goetzl EJ, Lee H, Azuma T, Stossel TP, Turck CW, Karliner JS (2000) Gelsolin binding and cellular presentation of lysophosphatidic acid. *The Journal of biological chemistry* 275:14573-14578

132. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, regulation and biological functions. *European journal of cell biology* 74:111-122

133. Goodner CJ, Sweet IR, Harrison HC, Jr. (1988) Rapid reduction and return of surface insulin receptors after exposure to brief pulses of insulin in perfused rat hepatocytes. *Diabetes* 37:1316-1323

134. Gram DX, Hansen AJ, Wilken M, Elm T, Svendsen O, Carr RD, Ahren B, Brand CL (2005) Plasma calcitonin gene-related peptide is increased prior to obesity, and sensory nerve desensitization by capsaicin improves oral glucose tolerance in obese zucker rats. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 153:963-969

135. Greene MW, Sakaue H, Wang L, Alessi DR, Roth RA (2003) Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by serine 312 phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 278:8199-8211

136. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF (2005) Positive and negative regulation of insulin signaling through irs-1 phosphorylation. *Biochimie* 87:99-109

137. Gupte R, Patil R, Liu J, Wang Y, Lee SC, Fujiwara Y, Fells J, Bolen AL, Emmons-Thompson K, Yates CR, Siddam A, Panupinthu N, Pham TC, Baker DL, Parrill AL, Mills GB, Tigyi G, Miller DD (2011) Benzyl and naphthalene methylphosphonic acid inhibitors of autotaxin with anti-invasive and anti-metastatic activity. *ChemMedChem* 6:922-935

138. Haase VH (2009) Pathophysiological consequences of hif activation: Hif as a modulator of fibrosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1177:57-65

139. Hahn A, Heusinger-Ribeiro J, Lanz T, Zenkel S, Goppelt-Strube M (2000) Induction of connective tissue growth factor by activation of heptahelical receptors. Modulation by rho proteins and the actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry* 275:37429-37435

140. Halberg N, Khan T, Trujillo ME, Wernstedt-Asterholm I, Attie AD, Sherwani S, Wang ZV, Landskroner-Eiger S, Dineen S, Magalang UJ, Brekken RA, Scherer PE (2009) Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Molecular and cellular biology* 29:4467-4483

141. Hama K, Aoki J, Bandoh K, Inoue A, Endo T, Amano T, Suzuki H, Arai H (2006) Lysophosphatidic receptor, lpa3, is positively and negatively regulated by progesterone and estrogen in the mouse uterus. *Life sciences* 79:1736-1740

142. Hama K, Aoki J, Inoue A, Endo T, Amano T, Motoki R, Kanai M, Ye X, Chun J, Matsuki N, Suzuki H, Shibasaki M, Arai H (2007) Embryo spacing and implantation timing are differentially regulated by lpa3-mediated lysophosphatidic acid signaling in mice. *Biology of reproduction* 77:954-959

143. Hammack BN, Fung KY, Hunsucker SW, Duncan MW, Burgoon MP, Owens GP, Gilden DH (2004) Proteomic analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Multiple sclerosis* 10:245-260

144. Hammar E, Tomas A, Bosco D, Halban PA (2009) Role of the rho-rock (rho-associated kinase) signaling pathway in the regulation of pancreatic beta-cell function. *Endocrinology* 150:2072-2079

145. Hausmann J, Kamtekar S, Christodoulou E, Day JE, Wu T, Fulkerson Z, Albers HM, van Meeteren LA, Houben AJ, van Zeijl L, Jansen S, Andries M, Hall T, Pegg LE, Benson TE, Kasiem M, Harlos K, Kooi CW, Smyth SS, Ovaa H, Bollen M, Morris AJ, Moolenaar WH, Perrakis A (2011) Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. *Nature structural & molecular biology* 18:198-204

146. Hausmann J, Perrakis A, Moolenaar WH (2013) Structure-function relationships of autotaxin, a secreted lysophospholipase d. *Advances in biological regulation* 53:112-117

147. Hayashi K, Takahashi M, Nishida W, Yoshida K, Ohkawa Y, Kitabatake A, Aoki J, Arai H, Sobue K (2001) Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acids. *Circulation research* 89:251-258

148. Heise CE, Santos WL, Schreihöfer AM, Heasley BH, Mukhin YV, Macdonald TL, Lynch KR (2001) Activity of 2-substituted lysophosphatidic acid (lpa) analogs at lpa receptors: Discovery of a lpa1/lpa3 receptor antagonist. *Molecular pharmacology* 60:1173-1180

149. Henegar C, Tordjman J, Achard V, Lacasa D, Cremer I, Guerre-Millo M, Poitou C, Basdevant A, Stich V, Viguerie N, Langin D, Bedossa P, Zucker JD, Clement K (2008) Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome biology* 9:R14

150. Heracek J, Sobotka V, Urban M (2012) [obesity and male infertility]. *Ceska gynekologie / Ceska lekarska spolecnost J Ev Purkyne* 77:450-456

151. Herr KJ, Herr DR, Lee CW, Noguchi K, Chun J (2011) Stereotyped fetal brain disorganization is induced by hypoxia and requires lysophosphatidic acid receptor 1 (lpa1) signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:15444-15449

152. Heusinger-Ribeiro J, Eberlein M, Wahab NA, Goppelt-Strüebe M (2001) Expression of connective tissue growth factor in human renal fibroblasts: Regulatory roles of rhoa and camp. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 12:1853-1861

153. Higami Y, Barger JL, Page GP, Allison DB, Smith SR, Prolla TA, Weindruch R (2006) Energy restriction lowers the expression of genes linked to inflammation, the cytoskeleton, the extracellular matrix, and angiogenesis in mouse adipose tissue. *The Journal of nutrition* 136:343-352

154. Hiramatsu T, Sonoda H, Takanezawa Y, Morikawa R, Ishida M, Kasahara K, Sanai Y, Taguchi R, Aoki J, Arai H (2003) Biochemical and molecular characterization of two phosphatidic acid-selective phospholipase a1s, mpa-pla1alpha and mpa-pla1beta. *The Journal of biological chemistry* 278:49438-49447

155. Hodson L, Humphreys SM, Karpe F, Frayn KN (2013) Metabolic signatures of human adipose tissue hypoxia in obesity. *Diabetes* 62:1417-1425

156. Holmstrom TE, Mattsson CL, Wang Y, Iakovleva I, Petrovic N, Nedergaard J (2010) Non-transactivational, dual pathways for lpa-induced erk1/2 activation in primary cultures of brown pre-adipocytes. *Experimental cell research* 316:2664-2675

157. Hope JM, Wang FQ, Whyte JS, Ariztia EV, Abdalla W, Long K, Fishman DA (2009) Lpa receptor 2 mediates lpa-induced endometrial cancer invasion. *Gynecologic oncology* 112:215-223

158. Hossain A, Yamaguchi F, Matsunaga T, Hirata Y, Kamitori K, Dong Y, Sui L, Tsukamoto I, Ueno M, Tokuda M (2012) Rare sugar d-psicose protects pancreas beta-islets and thus improves insulin resistance in oltf rats. *Biochemical and biophysical research communications* 425:717-723

159. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91

160. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM (1996) Irs-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in tnfr-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271:665-668

161. Hotary KB, Allen ED, Brooks PC, Datta NS, Long MW, Weiss SJ (2003) Membrane type i matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. *Cell* 114:33-45

162. Houstis N, Rosen ED, Lander ES (2006) Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440:944-948

163. Howard BV, Ruotolo G, Robbins DC (2003) Obesity and dyslipidemia. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 32:855-867

164. Huber J, Loffler M, Bilban M, Reimers M, Kadl A, Todoric J, Zeyda M, Geyeregger R, Schreiner M, Weichhart T, Leitinger N, Waldhausl W, Stulnig TM (2007) Prevention of high-fat diet-induced adipose tissue remodeling in obese diabetic mice by n-3 polyunsaturated fatty acids. *International journal of obesity* 31:1004-1013

165. Hursting SD, Dunlap SM (2012) Obesity, metabolic dysregulation, and cancer: A growing concern and an inflammatory (and microenvironmental) issue. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1271:82-87

166. Ibrahim MM (2010) Subcutaneous and visceral adipose tissue: Structural and functional differences. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 11:11-18

167. Ikeda H, Yatomi Y, Yanase M, Satoh H, Nishihara A, Kawabata M, Fujiwara K (1998) Effects of lysophosphatidic acid on proliferation of stellate cells and hepatocytes in culture. *Biochemical and biophysical research communications* 248:436-440

168. Ikeda H, Nagashima K, Yanase M, Tomiya T, Arai M, Inoue Y, Tejima K, Nishikawa T, Omata M, Kimura S, Fujiwara K (2003) Involvement of rho/rho kinase pathway in regulation of apoptosis in rat hepatic stellate cells. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 285:G880-886
169. Im DS, Fujioka T, Katada T, Kondo Y, Ui M, Okajima F (1997) Characterization of sphingosine 1-phosphate-induced actions and its signaling pathways in rat hepatocytes. *The American journal of physiology* 272:G1091-1099
170. Im DS (2012) First-in-class antifibrotic therapy targeting type 1 lysophosphatidic acid receptor. *Archives of pharmacal research* 35:945-948
171. Imperato PJ, Nayeri K (1991) Sources of encouragement or discouragement to students as they decided whether to enter medical school. *Academic medicine : journal of the Association of American Medical Colleges* 66:495
172. Inoue M, Rashid MH, Fujita R, Contos JJ, Chun J, Ueda H (2004) Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nature medicine* 10:712-718
173. Inoue M, Yamaguchi A, Kawakami M, Chun J, Ueda H (2006) Loss of spinal substance p pain transmission under the condition of lpa1 receptor-mediated neuropathic pain. *Molecular pain* 2:25
174. Inoue M, Ma L, Aoki J, Chun J, Ueda H (2008) Autotaxin, a synthetic enzyme of lysophosphatidic acid (lpa), mediates the induction of nerve-injured neuropathic pain. *Molecular pain* 4:6
175. Inoue M, Xie W, Matsushita Y, Chun J, Aoki J, Ueda H (2008) Lysophosphatidylcholine induces neuropathic pain through an action of autotaxin to generate lysophosphatidic acid. *Neuroscience* 152:296-298
176. Inouye KE, Shi H, Howard JK, Daly CH, Lord GM, Rollins BJ, Flier JS (2007) Absence of cc chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue. *Diabetes* 56:2242-2250
177. Islam MS (2010) Calcium signaling in the islets. *Advances in experimental medicine and biology* 654:235-259
178. Iyer A, Fairlie DP, Prins JB, Hammock BD, Brown L (2010) Inflammatory lipid mediators in adipocyte function and obesity. *Nature reviews Endocrinology* 6:71-82
179. Jager J, Gremeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF (2007) Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* 148:241-251

180. Jansen S, Stefan C, Creemers JW, Waelkens E, Van Eynde A, Stalmans W, Bollen M (2005) Proteolytic maturation and activation of autotaxin (npp2), a secreted metastasis-enhancing lysophospholipase d. *Journal of cell science* 118:3081-3089
181. Jansen S, Callewaert N, Dewerte I, Andries M, Ceulemans H, Bollen M (2007) An essential oligomannosidic glycan chain in the catalytic domain of autotaxin, a secreted lysophospholipase-d. *The Journal of biological chemistry* 282:11084-11091
182. Jansen S, Andries M, Vekemans K, Vanbilloen H, Verbruggen A, Bollen M (2009) Rapid clearance of the circulating metastatic factor autotaxin by the scavenger receptors of liver sinusoidal endothelial cells. *Cancer letters* 284:216-221
183. Jaworski DM, Sideleva O, Stradecki HM, Langlois GD, Habibovic A, Satish B, Tharp WG, Lausier J, Larock K, Jetton TL, Peshavaria M, Pratley RE (2011) Sexually dimorphic diet-induced insulin resistance in obese tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (timp-2)-deficient mice. *Endocrinology* 152:1300-1313
184. Jean C, Gravelle P, Fournie JJ, Laurent G (2011) Influence of stress on extracellular matrix and integrin biology. *Oncogene* 30:2697-2706
185. Jeon ES, Kim JH, Ryu H, Kim EK (2012) Lysophosphatidic acid activates tgfbip expression in human corneal fibroblasts through a tgfbeta1-dependent pathway. *Cellular signalling* 24:1241-1250
186. Kahn SE, Halban PA (1997) Release of incompletely processed proinsulin is the cause of the disproportionate proinsulinemia of niddm. *Diabetes* 46:1725-1732
187. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kowatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T (2006) Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *The Journal of biological chemistry* 281:26602-26614
188. Kaminska K, Wasielek M, Bogacka I, Blitek M, Bogacki M (2008) Quantitative expression of lysophosphatidic acid receptor 3 gene in porcine endometrium during the periimplantation period and estrous cycle. *Prostaglandins & other lipid mediators* 85:26-32
189. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M (2006) Mcp-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *The Journal of clinical investigation* 116:1494-1505
190. Kaneto H, Nakatani Y, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Hori M, Yamasaki Y (2005) Pdx-1/vp16 fusion protein, together with neurod or ngn3, markedly induces insulin gene transcription and ameliorates glucose tolerance. *Diabetes* 54:1009-1022

191. Kang L, Ayala JE, Lee-Young RS, Zhang Z, James FD, Neuffer PD, Pozzi A, Zutter MM, Wasserman DH (2011) Diet-induced muscle insulin resistance is associated with extracellular matrix remodeling and interaction with integrin $\alpha 2\beta 1$ in mice. *Diabetes* 60:416-426

192. Kang L, Lantier L, Kennedy A, Bonner JS, Mayes WH, Bracy DP, Bookbinder LH, Hasty AH, Thompson CB, Wasserman DH (2013) Hyaluronan accumulates with high-fat feeding and contributes to insulin resistance. *Diabetes* 62:1888-1896

193. Karliner JS, Honbo N, Summers K, Gray MO, Goetzl EJ (2001) The lysophospholipids sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid enhance survival during hypoxia in neonatal rat cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 33:1713-1717

194. Keely S, Glover LE, MacManus CF, Campbell EL, Scully MM, Furuta GT, Colgan SP (2009) Selective induction of integrin $\beta 1$ by hypoxia-inducible factor: Implications for wound healing. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23:1338-1346

195. Kehlen A, Lauterbach R, Santos AN, Thiele K, Kabisch U, Weber E, Riemann D, Langner J (2001) Il-1 β - and il-4-induced down-regulation of autotaxin mRNA and pc-1 in fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis (ra). *Clinical and experimental immunology* 123:147-154

196. Kelpke CL, Moore PC, Parazzoli SD, Wicksteed B, Rhodes CJ, Poitout V (2003) Palmitate inhibition of insulin gene expression is mediated at the transcriptional level via ceramide synthesis. *The Journal of biological chemistry* 278:30015-30021

197. Keophiphath M, Achard V, Henegar C, Rouault C, Clement K, Lacasa D (2009) Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes. *Molecular endocrinology* 23:11-24

198. Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang ZV, Chandalia M, Abate N, Zhang BB, Bonaldo P, Chua S, Scherer PE (2009) Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: Role of collagen vi. *Molecular and cellular biology* 29:1575-1591

199. Kim HJ, Higashimori T, Park SY, Choi H, Dong J, Kim YJ, Noh HL, Cho YR, Cline G, Kim YB, Kim JK (2004) Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes* 53:1060-1067

200. Kissler HJ, Settmacher U (2013) Bariatric surgery to treat obesity. *Seminars in nephrology* 33:75-89

201. Kitayama J, Shida D, Sako A, Ishikawa M, Hama K, Aoki J, Arai H, Nagawa H (2004) Over-expression of lysophosphatidic acid receptor-2 in human invasive ductal carcinoma. Breast cancer research : BCR 6:R640-646
202. Koike S, Yutoh Y, Keino-Masu K, Noji S, Masu M, Ohuchi H (2011) Autotaxin is required for the cranial neural tube closure and establishment of the midbrain-hindbrain boundary during mouse development. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists 240:413-421
203. Koike T, Kimura N, Miyazaki K, Yabuta T, Kumamoto K, Takenoshita S, Chen J, Kobayashi M, Hosokawa M, Taniguchi A, Kojima T, Ishida N, Kawakita M, Yamamoto H, Takematsu H, Suzuki A, Kozutsumi Y, Kannagi R (2004) Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: A missing link between warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101:8132-8137
204. Komachi M, Damirin A, Malchinkhuu E, Mogi C, Tobo M, Ohta H, Sato K, Tomura H, Okajima F (2009) Signaling pathways involved in DNA synthesis and migration in response to lysophosphatidic acid and low-density lipoprotein in coronary artery smooth muscle cells. Vascular pharmacology 50:178-184
205. Krieger-Brauer HI, Kather H (1992) Human fat cells possess a plasma membrane-bound h2o2-generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the receptor kinase. The Journal of clinical investigation 89:1006-1013
206. Lambeau G, Gelb MH (2008) Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases a2. Annual review of biochemistry 77:495-520
207. Lau CK, Yang ZF, Lam CT, Tam KH, Poon RT, Fan ST (2006) Suppression of hypoxia inducible factor-1alpha (hif-1alpha) by yc-1 is dependent on murine double minute 2 (mdm2). Biochemical and biophysical research communications 348:1443-1448
208. Leask A, Abraham DJ (2004) Tgf-beta signaling and the fibrotic response. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 18:816-827
209. Lee MJ, Wu Y, Fried SK (2010) Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care 13:371-376
210. Lee S, Jeong J, Majewski T, Scherer SE, Kim MS, Tuziak T, Tang KS, Baggerly K, Grossman HB, Zhou JH, Shen L, Bondaruk J, Ahmed SS, Samanta S, Spiess P, Wu X, Filipek S, McConkey D, Bar-Eli M, Issa JP, Benedict WF, Czerniak B (2007) Forerunner genes contiguous to rb1 contribute to the development of in situ neoplasia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104:13732-13737

211. Lee SH, Park HS, Lee JA, Song YS, Jang YJ, Kim JH, Lee YJ, Heo Y (2013) Fibronectin gene expression in human adipose tissue and its associations with obesity-related genes and metabolic parameters. *Obesity surgery* 23:554-560
212. Lee Z, Cheng CT, Zhang H, Subler MA, Wu J, Mukherjee A, Windle JJ, Chen CK, Fang X (2008) Role of Ipa4/p2y9/gpr23 in negative regulation of cell motility. *Molecular biology of the cell* 19:5435-5445
213. Leve F, Marcondes TG, Bastos LG, Rabello SV, Tanaka MN, Morgado-Diaz JA (2011) Lysophosphatidic acid induces a migratory phenotype through a crosstalk between rhoa-rock and src-fak signalling in colon cancer cells. *European journal of pharmacology* 671:7-17
214. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A (2002) Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocrine reviews* 23:201-229
215. Li L, Tam L, Liu L, Jin T, Ng DS (2011) Wnt-signaling mediates the anti-adipogenic action of lysophosphatidic acid through cross talking with the rho/rho associated kinase (rock) pathway. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 89:515-521
216. Li Q, Hata A, Kosugi C, Kataoka N, Funaki M (2010) The density of extracellular matrix proteins regulates inflammation and insulin signaling in adipocytes. *FEBS letters* 584:4145-4150
217. Li SH, Shin DH, Chun YS, Lee MK, Kim MS, Park JW (2008) A novel mode of action of yc-1 in hif inhibition: Stimulation of fih-dependent p300 dissociation from hif-1{alpha}. *Molecular cancer therapeutics* 7:3729-3738
218. Li Y, Tong X, Rumala C, Clemons K, Wang S (2011) Thrombospondin1 deficiency reduces obesity-associated inflammation and improves insulin sensitivity in a diet-induced obese mouse model. *PloS one* 6:e26656
219. Ligon B, Boyd AE, 3rd, Dunlap K (1998) Class a calcium channel variants in pancreatic islets and their role in insulin secretion. *The Journal of biological chemistry* 273:13905-13911
220. Lijnen HR, Maquoi E, Demeulemeester D, Van Hoef B, Collen D (2002) Modulation of fibrinolytic and gelatinolytic activity during adipose tissue development in a mouse model of nutritionally induced obesity. *Thrombosis and haemostasis* 88:345-353
221. Lijnen HR (2008) Angiogenesis and obesity. *Cardiovascular research* 78:286-293
222. Lijnen HR (2009) Role of fibrinolysis in obesity and thrombosis. *Thrombosis research* 123 Suppl 4:S46-49

223. Lin ME, Rivera RR, Chun J (2012) Targeted deletion of Ipa5 identifies novel roles for lysophosphatidic acid signaling in development of neuropathic pain. *The Journal of biological chemistry* 287:17608-17617
224. Lionetti L, Mollica MP, Lombardi A, Cavaliere G, Gifuni G, Barletta A (2009) From chronic overnutrition to insulin resistance: The role of fat-storing capacity and inflammation. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* 19:146-152
225. Liszewska E, Reinaud P, Billon-Denis E, Dubois O, Robin P, Charpigny G (2009) Lysophosphatidic acid signaling during embryo development in sheep: Involvement in prostaglandin synthesis. *Endocrinology* 150:422-434
226. Liszewska E, Reinaud P, Dubois O, Charpigny G (2012) Lysophosphatidic acid receptors in ovine uterus during estrous cycle and early pregnancy and their regulation by progesterone. *Domestic animal endocrinology* 42:31-42
227. Lolmede K, Durand de Saint Front V, Galitzky J, Lafontan M, Bouloumie A (2003) Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442a adipocytes. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 27:1187-1195
228. Lou L, Chen YX, Jin L, Li X, Tao X, Zhu J, Chen X, Wu S, Ye W, He J, Ding G (2013) Enhancement of invasion of hepatocellular carcinoma cells through lysophosphatidic acid receptor. *The Journal of international medical research* 41:55-63
229. Loubatieres-Mariani MM, Chapa J, Puech R, Manteghetti M (1980) A different action of hypothermia on insulin release from the isolated, perfused rat pancreas, depending on the stimulating agent. *Diabetes* 29:895-898
230. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR (2007) Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation* 117:175-184
231. Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR (2007) Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 56:16-23
232. Lundgren M, Svensson M, Lindmark S, Renstrom F, Ruge T, Eriksson JW (2007) Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and 'hyperleptinaemia'. *Diabetologia* 50:625-633
233. Lupi R, Del Guerra S, Mancarella R, Novelli M, Valgimigli L, Pedulli GF, Paolini M, Soleti A, Filipponi F, Mosca F, Boggi U, Del Prato S, Masiello P, Marchetti P (2007) Insulin secretion defects of human type 2 diabetic islets are corrected in vitro by a new reactive oxygen species scavenger. *Diabetes & metabolism* 33:340-345

234. Ma L, Matsumoto M, Xie W, Inoue M, Ueda H (2009) Evidence for lysophosphatidic acid 1 receptor signaling in the early phase of neuropathic pain mechanisms in experiments using ki-16425, a lysophosphatidic acid 1 receptor antagonist. *Journal of neurochemistry* 109:603-610
235. Ma L, Uchida H, Nagai J, Inoue M, Aoki J, Ueda H (2010) Evidence for de novo synthesis of lysophosphatidic acid in the spinal cord through phospholipase a2 and autotaxin in nerve injury-induced neuropathic pain. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 333:540-546
236. Mandal S, Hart N (2012) Respiratory complications of obesity. *Clinical medicine* 12:75-78
237. Maquoi E, Munaut C, Colige A, Collen D, Lijnen HR (2002) Modulation of adipose tissue expression of murine matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors with obesity. *Diabetes* 51:1093-1101
238. Mariman EC, Wang P (2010) Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67:1277-1292
239. Martin ML, Jensen MD (1991) Effects of body fat distribution on regional lipolysis in obesity. *The Journal of clinical investigation* 88:609-613
240. Massiera F, Saint-Marc P, Seydoux J, Murata T, Kobayashi T, Narumiya S, Guesnet P, Amri EZ, Negrel R, Ailhaud G (2003) Arachidonic acid and prostacyclin signaling promote adipose tissue development: A human health concern? *Journal of lipid research* 44:271-279
241. McGarry JD (2002) Banting lecture 2001: Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 51:7-18
242. McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, St Hilaire A, Xu Y, Hinshaw JC, Zimmerman GA, Hama K, Aoki J, Arai H, Prestwich GD (2003) Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (lpa): Lpa is a transcellular ppargamma agonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:131-136
243. Medrikova D, Jilkova ZM, Bardova K, Janovska P, Rossmeisl M, Kopecky J (2012) Sex differences during the course of diet-induced obesity in mice: Adipose tissue expandability and glycemic control. *International journal of obesity* 36:262-272
244. Meissburger B, Stachorski L, Roder E, Rudofsky G, Wolfrum C (2011) Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 (timp1) controls adipogenesis in obesity in mice and in humans. *Diabetologia* 54:1468-1479

245. Messier V, Karelis AD, Robillard ME, Bellefeuille P, Brochu M, Lavoie JM, Rabasa-Lhoret R (2010) Metabolically healthy but obese individuals: Relationship with hepatic enzymes. *Metabolism: clinical and experimental* 59:20-24

246. Mills GB, Moolenaar WH (2003) The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nature reviews Cancer* 3:582-591

247. Milner R, Hung S, Erokwi B, Dore-Duffy P, LaManna JC, del Zoppo GJ (2008) Increased expression of fibronectin and the alpha 5 beta 1 integrin in angiogenic cerebral blood vessels of mice subject to hypobaric hypoxia. *Molecular and cellular neurosciences* 38:43-52

248. Monnier L, Colette C, Mas E, Michel F, Cristol JP, Boegner C, Owens DR (2010) Regulation of oxidative stress by glycaemic control: Evidence for an independent inhibitory effect of insulin therapy. *Diabetologia* 53:562-571

249. Morange PE, Bastelica D, Bonzi MF, Van Hoef B, Collen D, Juhan-Vague I, Lijnen HR (2002) Influence of t-pa and u-pa on adipose tissue development in a murine model of diet-induced obesity. *Thrombosis and haemostasis* 87:306-310

250. Morisseau C, Schebb NH, Dong H, Ulu A, Aronov PA, Hammock BD (2012) Role of soluble epoxide hydrolase phosphatase activity in the metabolism of lysophosphatidic acids. *Biochemical and biophysical research communications* 419:796-800

251. Murakami M, Shiraishi A, Tabata K, Fujita N (2008) Identification of the orphan gpcr, p2y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 371:707-712

252. Murakami M, Taketomi Y, Sato H, Yamamoto K (2011) Secreted phospholipase a2 revisited. *Journal of biochemistry* 150:233-255

253. Murch O, Collin M, Thiernemann C (2007) Lysophosphatidic acid reduces the organ injury caused by endotoxemia-a role for g-protein-coupled receptors and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Shock* 27:48-54

254. Murph M, Mills GB (2007) Targeting the lipids lpa and s1p and their signalling pathways to inhibit tumour progression. *Expert reviews in molecular medicine* 9:1-18

255. Myllyharju J, Schipani E (2010) Extracellular matrix genes as hypoxia-inducible targets. *Cell and tissue research* 339:19-29

256. Nagao K, Yanagita T (2008) Bioactive lipids in metabolic syndrome. *Progress in lipid research* 47:127-146

257. Nakajima I, Muroya S, Tanabe R, Chikuni K (2002) Extracellular matrix development during differentiation into adipocytes with a unique increase in type v and vi collagen. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 94:197-203

258. Nakamura K, Igarashi K, Ide K, Ohkawa R, Okubo S, Yokota H, Masuda A, Oshima N, Takeuchi T, Nangaku M, Okudaira S, Arai H, Ikeda H, Aoki J, Yatomi Y (2008) Validation of an autotaxin enzyme immunoassay in human serum samples and its application to hypoalbuminemia differentiation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 388:51-58

259. Nakamura T, Furuhashi M, Li P, Cao H, Tuncman G, Sonenberg N, Gorgun CZ, Hotamisligil GS (2010) Double-stranded rna-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. *Cell* 140:338-348

260. Nakanaga K, Hama K, Aoki J (2010) Autotaxin--an lpa producing enzyme with diverse functions. *Journal of biochemistry* 148:13-24

261. Nam SW, Clair T, Kim YS, McMarlin A, Schiffmann E, Liotta LA, Stracke ML (2001) Autotaxin (npp-2), a metastasis-enhancing motogen, is an angiogenic factor. *Cancer research* 61:6938-6944

262. Naour N, Rouault C, Fellahi S, Lavoie ME, Poitou C, Keophiphath M, Eberle D, Shoelson S, Rizkalla S, Bastard JP, Rabasa-Lhoret R, Clement K, Guerre-Millo M (2010) Cathepsins in human obesity: Changes in energy balance predominantly affect cathepsin s in adipose tissue and in circulation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95:1861-1868

263. Napolitano L (1963) The differentiation of white adipose cells. An electron microscope study. *The Journal of cell biology* 18:663-679

264. Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato EL, Procopio J, Morgan D, Oliveira-Emilio HC, Carpinelli AR, Curi R (2007) Diabetes associated cell stress and dysfunction: Role of mitochondrial and non-mitochondrial ros production and activity. *The Journal of physiology* 583:9-24

265. Nieto-Posadas A, Picazo-Juarez G, Llorente I, Jara-Oseguera A, Morales-Lazaro S, Escalante-Alcalde D, Islas LD, Rosenbaum T (2012) Lysophosphatidic acid directly activates trpv1 through a c-terminal binding site. *Nature chemical biology* 8:78-85

266. Nishimasu H, Okudaira S, Hama K, Mihara E, Dohmae N, Inoue A, Ishitani R, Takagi J, Aoki J, Nureki O (2011) Crystal structure of autotaxin and insight into gpcr activation by lipid mediators. *Nature structural & molecular biology* 18:205-212

267. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R (2009) Cd8+ effector t cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature medicine* 15:914-920

268. Node K, Huo Y, Ruan X, Yang B, Spiecker M, Ley K, Zeldin DC, Liao JK (1999) Anti-inflammatory properties of cytochrome p450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science* 285:1276-1279
269. Noguchi K, Herr D, Mutoh T, Chun J (2009) Lysophosphatidic acid (lpa) and its receptors. *Current opinion in pharmacology* 9:15-23
270. Noguchi M, Hosoda K, Fujikura J, Fujimoto M, Iwakura H, Tomita T, Ishii T, Arai N, Hirata M, Ebihara K, Masuzaki H, Itoh H, Narumiya S, Nakao K (2007) Genetic and pharmacological inhibition of rho-associated kinase ii enhances adipogenesis. *The Journal of biological chemistry* 282:29574-29583
271. Nolan CJ, Damm P, Prentki M (2011) Type 2 diabetes across generations: From pathophysiology to prevention and management. *Lancet* 378:169-181
272. Noria SF, Grantcharov T (2013) Biological effects of bariatric surgery on obesity-related comorbidities. *Canadian journal of surgery Journal canadien de chirurgie* 56:47-57
273. Norman DD, Ibezim A, Scott WE, White S, Parrill AL, Baker DL (2013) Autotaxin inhibition: Development and application of computational tools to identify site-selective lead compounds. *Bioorganic & medicinal chemistry*
274. O'Meara NM, Sturis J, Blackman JD, Byrne MM, Jaspan JB, Roland DC, Thistlethwaite JR, Polonsky KS (1993) Oscillatory insulin secretion after pancreas transplant. *Diabetes* 42:855-861
275. O'Rahilly S, Turner RC, Matthews DR (1988) Impaired pulsatile secretion of insulin in relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes. *The New England journal of medicine* 318:1225-1230
276. Ogasawara M, Hirose A, Ono M, Aritake K, Nozaki Y, Takahashi M, Okamoto N, Sakamoto S, Iwasaki S, Asanuma T, Taniguchi T, Urade Y, Onishi S, Saibara T, Oben JA (2011) A novel and comprehensive mouse model of human non-alcoholic steatohepatitis with the full range of dysmetabolic and histological abnormalities induced by gold thioglucose and a high-fat diet. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 31:542-551
277. Ogihara T, Asano T, Katagiri H, Sakoda H, Anai M, Shojima N, Ono H, Fujishiro M, Kushiya A, Fukushima Y, Kikuchi M, Noguchi N, Aburatani H, Gotoh Y, Komuro I, Fujita T (2004) Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor-kappa b pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase. *Diabetologia* 47:794-805
278. Ohta H, Sato K, Murata N, Damirin A, Malchinkhuu E, Kon J, Kimura T, Tobo M, Yamazaki Y, Watanabe T, Yagi M, Sato M, Suzuki R, Murooka H, Sakai T, Nishitoba T, Im DS, Nochi H, Tamoto K, Tomura H, Okajima F (2003) Ki16425, a subtype-selective antagonist for edg-family lysophosphatidic acid receptors. *Molecular pharmacology* 64:994-1005

279. Oka S, Ota R, Shima M, Yamashita A, Sugiura T (2010) Gpr35 is a novel lysophosphatidic acid receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 395:232-237
280. Okudaira S, Yukiura H, Aoki J (2010) Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie* 92:698-706
281. Okusa MD, Ye H, Huang L, Sigismund L, Macdonald T, Lynch KR (2003) Selective blockade of lysophosphatidic acid lpa3 receptors reduces murine renal ischemia-reperfusion injury. *American journal of physiology Renal physiology* 285:F565-574
282. Orosa B, Garcia S, Martinez P, Gonzalez A, Gomez-Reino JJ, Conde C (2013) Lysophosphatidic acid receptor inhibition as a new multipronged treatment for rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*
283. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306:457-461
284. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Gorgun CZ, Hotamisligil GS (2006) Chemical chaperones reduce er stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 313:1137-1140
285. Pages C, Daviaud D, An S, Krief S, Lafontan M, Valet P, Saulnier-Blache JS (2001) Endothelial differentiation gene-2 receptor is involved in lysophosphatidic acid-dependent control of 3t3f442a preadipocyte proliferation and spreading. *The Journal of biological chemistry* 276:11599-11605
286. Palmer RK, Lunn CA (2013) Trp channels as targets for therapeutic intervention in obesity: Focus on trpv1 and trpm5. *Current topics in medicinal chemistry* 13:247-257
287. Pan HL, Zhang YQ, Zhao ZQ (2010) Involvement of lysophosphatidic acid in bone cancer pain by potentiation of trpv1 via pkcepsilon pathway in dorsal root ganglion neurons. *Molecular pain* 6:85
288. Panchatcharam M, Miriyala S, Yang F, Rojas M, End C, Vallant C, Dong A, Lynch K, Chun J, Morris AJ, Smyth SS (2008) Lysophosphatidic acid receptors 1 and 2 play roles in regulation of vascular injury responses but not blood pressure. *Circulation research* 103:662-670
289. Pardo M, Roca-Rivada A, Seoane LM, Casanueva FF (2012) Obesidomics: Contribution of adipose tissue secretome analysis to obesity research. *Endocrine* 41:374-383
290. Parker RA, Flint OP, Mulvey R, Elosua C, Wang F, Fenderson W, Wang S, Yang WP, Noor MA (2005) Endoplasmic reticulum stress links dyslipidemia to inhibition of proteasome activity and glucose transport by hiv protease inhibitors. *Molecular pharmacology* 67:1909-1919

291. Pasarica M, Gowronska-Kozak B, Burk D, Remedios I, Hymel D, Gimble J, Ravussin E, Bray GA, Smith SR (2009) Adipose tissue collagen vi in obesity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94:5155-5162
292. Pasternack SM, von Kugelgen I, Al Aboud K, Lee YA, Ruschendorf F, Voss K, Hillmer AM, Molderings GJ, Franz T, Ramirez A, Nurnberg P, Nothen MM, Betz RC (2008) G protein-coupled receptor p2y5 and its ligand lpa are involved in maintenance of human hair growth. *Nature genetics* 40:329-334
293. Peiris AN, Stagner JI, Vogel RL, Nakagawa A, Samols E (1992) Body fat distribution and peripheral insulin sensitivity in healthy men: Role of insulin pulsatility. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 75:290-294
294. Perreault M, Marette A (2001) Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nature medicine* 7:1138-1143
295. Pettersson M, Ahren B, Bottcher G, Sundler F (1986) Calcitonin gene-related peptide: Occurrence in pancreatic islets in the mouse and the rat and inhibition of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology* 119:865-869
296. Pettersson M, Ahren B (1990) Calcitonin gene-related peptide inhibits insulin secretion studies on ion fluxes and cyclic amp in isolated rat islets. *Diabetes research* 15:9-14
297. Peyruchaud O (2009) Novel implications for lysophospholipids, lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate, as drug targets in cancer. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 9:381-391
298. Pierleoni C, Verdenelli F, Castellucci M, Cinti S (1998) Fibronectins and basal lamina molecules expression in human subcutaneous white adipose tissue. *European journal of histochemistry : EJH* 42:183-188
299. Piro S, Anello M, Di Pietro C, Lizzio MN, Patane G, Rabuazzo AM, Vigneri R, Purrello M, Purrello F (2002) Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: Possible role of oxidative stress. *Metabolism: clinical and experimental* 51:1340-1347
300. Poitout V, Amyot J, Semache M, Zarrouki B, Hagman D, Fontes G (2010) Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochimica et biophysica acta* 1801:289-298
301. Pradere JP, Klein J, Gres S, Guigne C, Neau E, Valet P, Calise D, Chun J, Bascands JL, Saulnier-Blache JS, Schanstra JP (2007) Lpa1 receptor activation promotes renal interstitial fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 18:3110-3118

302. Pradere JP, Tarnus E, Gres S, Valet P, Saulnier-Blache JS (2007) Secretion and lysophospholipase d activity of autotaxin by adipocytes are controlled by n-glycosylation and signal peptidase. *Biochimica et biophysica acta* 1771:93-102
303. Pradere JP, Gonzalez J, Klein J, Valet P, Gres S, Salant D, Bascands JL, Saulnier-Blache JS, Schanstra JP (2008) Lysophosphatidic acid and renal fibrosis. *Biochimica et biophysica acta* 1781:582-587
304. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM (2001) C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 286:327-334
305. Primeau V, Coderre L, Karelis AD, Brochu M, Lavoie ME, Messier V, Sladek R, Rabasa-Lhoret R (2011) Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. *International journal of obesity* 35:971-981
306. Priyadarshini M, Kamal MA, Greig NH, Realef M, Abuzenadah AM, Chaudhary AG, Damanhour GA (2012) Alzheimer's disease and type 2 diabetes: Exploring the association to obesity and tyrosine hydroxylase. *CNS & neurological disorders drug targets* 11:482-489
307. Proud CG (2006) Regulation of protein synthesis by insulin. *Biochemical Society transactions* 34:213-216
308. Pulinilkunnit T, An D, Ghosh S, Qi D, Kewalramani G, Yuen G, Virk N, Abrahani A, Rodrigues B (2005) Lysophosphatidic acid-mediated augmentation of cardiomyocyte lipoprotein lipase involves actin cytoskeleton reorganization. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 288:H2802-2810
309. Pyne S, Kong KC, Darroch PI (2004) Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate biology: The role of lipid phosphate phosphatases. *Seminars in cell & developmental biology* 15:491-501
310. Qian Y, Hamilton M, Sidduri A, Gabriel S, Ren Y, Peng R, Kondru R, Narayanan A, Truitt T, Hamid R, Chen Y, Zhang L, Fretland AJ, Sanchez RA, Chang KC, Lucas M, Schoenfeld RC, Laine D, Fuentes ME, Stevenson CS, Budd DC (2012) Discovery of highly selective and orally active lysophosphatidic acid receptor-1 antagonists with potent activity on human lung fibroblasts. *Journal of medicinal chemistry* 55:7920-7939
311. Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC (2008) Adipokines and insulin resistance. *Molecular medicine* 14:741-751
312. Rancoule C, Pradere JP, Gonzalez J, Klein J, Valet P, Bascands JL, Schanstra JP, Saulnier-Blache JS (2011) Lysophosphatidic acid-1-receptor targeting agents for fibrosis. *Expert opinion on investigational drugs* 20:657-667

313. Rodgers RJ, Tschop MH, Wilding JP (2012) Anti-obesity drugs: Past, present and future. *Disease models & mechanisms* 5:621-626

314. Rotter V, Nagaev I, Smith U (2003) Interleukin-6 (il-6) induces insulin resistance in 3t3-l1 adipocytes and is, like il-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *The Journal of biological chemistry* 278:45777-45784

315. Rusovici R, Ghaleb A, Shim H, Yang VW, Yun CC (2007) Lysophosphatidic acid prevents apoptosis of caco-2 colon cancer cells via activation of mitogen-activated protein kinase and phosphorylation of bad. *Biochimica et biophysica acta* 1770:1194-1203

316. Rutkowski JM, Davis KE, Scherer PE (2009) Mechanisms of obesity and related pathologies: The macro- and microcirculation of adipose tissue. *The FEBS journal* 276:5738-5746

317. Sahin-Efe A, Katsikeris F, Mantzoros CS (2012) Advances in adipokines. *Metabolism: clinical and experimental* 61:1659-1665

318. Sakai N, Chun J, Duffield JS, Wada T, Luster AD, Tager AM (2013) Lpa1-induced cytoskeleton reorganization drives fibrosis through ctgf-dependent fibroblast proliferation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27:1830-1846

319. Sakai T, Peyruchaud O, Fassler R, Mosher DF (1998) Restoration of beta1a integrins is required for lysophosphatidic acid-induced migration of beta1-null mouse fibroblastic cells. *The Journal of biological chemistry* 273:19378-19382

320. Sako A, Kitayama J, Shida D, Suzuki R, Sakai T, Ohta H, Nagawa H (2006) Lysophosphatidic acid (lpa)-induced vascular endothelial growth factor (vegf) by mesothelial cells and quantification of host-derived vegf in malignant ascites. *The Journal of surgical research* 130:94-101

321. Salans LB, Horton ES, Sims EA (1971) Experimental obesity in man: Cellular character of the adipose tissue. *The Journal of clinical investigation* 50:1005-1011

322. Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806

323. Samad F, Hester KD, Yang G, Hannun YA, Bielawski J (2006) Altered adipose and plasma sphingolipid metabolism in obesity: A potential mechanism for cardiovascular and metabolic risk. *Diabetes* 55:2579-2587

324. Samadi N, Bekele R, Capatos D, Venkatraman G, Sariahmetoglu M, Brindley DN (2011) Regulation of lysophosphatidate signaling by autotaxin and lipid phosphate phosphatases with respect to tumor progression, angiogenesis, metastasis and chemo-resistance. *Biochimie* 93:61-70

325. Saulnier-Blache JS (2004) [lysophosphatidic acid: A "bioactive" phospholipid]. *Medecine sciences : M/S* 20:799-803
326. Saunders LP, Ouellette A, Bandle R, Chang WC, Zhou H, Misra RN, De La Cruz EM, Braddock DT (2008) Identification of small-molecule inhibitors of autotaxin that inhibit melanoma cell migration and invasion. *Molecular cancer therapeutics* 7:3352-3362
327. Scherer PE, Bickel PE, Kotler M, Lodish HF (1998) Cloning of cell-specific secreted and surface proteins by subtractive antibody screening. *Nature biotechnology* 16:581-586
328. Schmitz-Peiffer C, Laybutt DR, Burchfield JG, Gurisik E, Narasimhan S, Mitchell CJ, Pedersen DJ, Braun U, Cooney GJ, Leitges M, Biden TJ (2007) Inhibition of pkcepsilon improves glucose-stimulated insulin secretion and reduces insulin clearance. *Cell metabolism* 6:320-328
329. Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS, Jr. (1999) Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappab kinase activity and nuclear factor kappab DNA binding. *The Journal of biological chemistry* 274:31868-31874
330. Schulte KM, Beyer A, Kohrer K, Oberhauser S, Roher HD (2001) Lysophosphatidic acid, a novel lipid growth factor for human thyroid cells: Over-expression of the high-affinity receptor edg4 in differentiated thyroid cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 92:249-256
331. Sellam J, Berenbaum F (2012) [osteoarthritis and obesity]. *La Revue du praticien* 62:621-624
332. Shah BH, Catt KJ (2005) Roles of lpa3 and cox-2 in implantation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 16:397-399
333. Shida D, Watanabe T, Aoki J, Hama K, Kitayama J, Sonoda H, Kishi Y, Yamaguchi H, Sasaki S, Sako A, Konishi T, Arai H, Nagawa H (2004) Aberrant expression of lysophosphatidic acid (lpa) receptors in human colorectal cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 84:1352-1362
334. Shin DH, Kim JH, Jung YJ, Kim KE, Jeong JM, Chun YS, Park JW (2007) Preclinical evaluation of yc-1, a hif inhibitor, for the prevention of tumor spreading. *Cancer letters* 255:107-116
335. Shin MK, Drager LF, Yao Q, Bevans-Fonti S, Yoo DY, Jun JC, Aja S, Bhanot S, Polotsky VY (2012) Metabolic consequences of high-fat diet are attenuated by suppression of hif-1alpha. *PLoS one* 7:e46562
336. Shinkuma S, Akiyama M, Inoue A, Aoki J, Natsuga K, Nomura T, Arita K, Abe R, Ito K, Nakamura H, Ujiie H, Shibaki A, Suga H, Tsunemi Y, Nishie W, Shimizu H (2010) Prevalent liph founder

mutations lead to loss of p2y5 activation ability of pa-pla1alpha in autosomal recessive hypotrichosis. Human mutation 31:602-610

337. Simon MF, Daviaud D, Pradere JP, Gres S, Guigne C, Wabitsch M, Chun J, Valet P, Saulnier-Blache JS (2005) Lysophosphatidic acid inhibits adipocyte differentiation via lysophosphatidic acid 1 receptor-dependent down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. The Journal of biological chemistry 280:14656-14662

338. Sonoda H, Aoki J, Hiramatsu T, Ishida M, Bandoh K, Nagai Y, Taguchi R, Inoue K, Arai H (2002) A novel phosphatidic acid-selective phospholipase a1 that produces lysophosphatidic acid. The Journal of biological chemistry 277:34254-34263

339. Sorokin L (2010) The impact of the extracellular matrix on inflammation. Nature reviews Immunology 10:712-723

340. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Naslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Ryden M, Frisen J, Arner P (2008) Dynamics of fat cell turnover in humans. Nature 453:783-787

341. Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, Rasouli N, Gurley CM, Zhu B, Peterson CA, Kern PA (2010) Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen vi and fibrosis and demonstrate alternative activation. American journal of physiology Endocrinology and metabolism 299:E1016-1027

342. Spencer M, Unal R, Zhu B, Rasouli N, McGehee RE, Jr., Peterson CA, Kern PA (2011) Adipose tissue extracellular matrix and vascular abnormalities in obesity and insulin resistance. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 96:E1990-1998

343. Spiridonov VK, Vorob'eva NF (2000) The effects of stimulation and lesioning of afferent nerves on blood glucose and free fatty acid contents in rats in conditions of changing glycemia. Neuroscience and behavioral physiology 30:207-211

344. St-Coeur PD, Ferguson D, Morin P, Jr., Touaibia M (2013) Pf-8380 and closely related analogs: Synthesis and structure-activity relationship towards autotaxin inhibition and glioma cell viability. Archiv der Pharmazie 346:91-97

345. Stagner JI, Samols E, Weir GC (1980) Sustained oscillations of insulin, glucagon, and somatostatin from the isolated canine pancreas during exposure to a constant glucose concentration. The Journal of clinical investigation 65:939-942

346. Stapleton CM, Mashek DG, Wang S, Nagle CA, Cline GW, Thuillier P, Leesnitzer LM, Li LO, Stimmel JB, Shulman GI, Coleman RA (2011) Lysophosphatidic acid activates peroxisome proliferator activated receptor-gamma in cho cells that over-express glycerol 3-phosphate acyltransferase-1. PloS one 6:e18932

347. Stefan N, Kantartzis K, Machann J, Schick F, Thamer C, Rittig K, Balletshofer B, Machicao F, Fritsche A, Haring HU (2008) Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. *Archives of internal medicine* 168:1609-1616
348. Sturm A, Sudermann T, Schulte KM, Goebell H, Dignass AU (1999) Modulation of intestinal epithelial wound healing in vitro and in vivo by lysophosphatidic acid. *Gastroenterology* 117:368-377
349. Subramanian P, Karshovska E, Reinhard P, Megens RT, Zhou Z, Akhtar S, Schumann U, Li X, van Zandvoort M, Ludin C, Weber C, Schober A (2010) Lysophosphatidic acid receptors lpa1 and lpa3 promote cxcl12-mediated smooth muscle progenitor cell recruitment in neointima formation. *Circulation research* 107:96-105
350. Sumida H, Noguchi K, Kihara Y, Abe M, Yanagida K, Hamano F, Sato S, Tamaki K, Morishita Y, Kano MR, Iwata C, Miyazono K, Sakimura K, Shimizu T, Ishii S (2010) Lpa4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood* 116:5060-5070
351. Sumida H, Nakamura K, Yanagida K, Ohkawa R, Asano Y, Kadono T, Tamaki K, Igarashi K, Aoki J, Sato S, Ishii S, Shimizu T, Yatomi Y (2013) Decrease in circulating autotaxin by oral administration of prednisolone. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 415:74-80
352. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE (2011) Adipose tissue remodeling and obesity. *The Journal of clinical investigation* 121:2094-2101
353. Sun K, Halberg N, Khan M, Magalang UJ, Scherer PE (2013) Selective inhibition of hypoxia-inducible factor 1alpha ameliorates adipose tissue dysfunction. *Molecular and cellular biology* 33:904-917
354. Swaney JS, Chapman C, Correa LD, Stebbins KJ, Bunday RA, Prodanovich PC, Fagan P, Baccei CS, Santini AM, Hutchinson JH, Seiders TJ, Parr TA, Prasit P, Evans JF, Lorrain DS (2010) A novel, orally active lpa(1) receptor antagonist inhibits lung fibrosis in the mouse bleomycin model. *British journal of pharmacology* 160:1699-1713
355. Swaney JS, Chapman C, Correa LD, Stebbins KJ, Broadhead AR, Bain G, Santini AM, Darlington J, King CD, Baccei CS, Lee C, Parr TA, Roppe JR, Seiders TJ, Ziff J, Prasit P, Hutchinson JH, Evans JF, Lorrain DS (2011) Pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of an oral lysophosphatidic acid type 1 receptor-selective antagonist. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 336:693-700
356. Szabat M, Lynn FC, Hoffman BG, Kieffer TJ, Allan DW, Johnson JD (2012) Maintenance of beta-cell maturity and plasticity in the adult pancreas: Developmental biology concepts in adult physiology. *Diabetes* 61:1365-1371

357. Tager AM, LaCamera P, Shea BS, Campanella GS, Selman M, Zhao Z, Polosukhin V, Wain J, Karimi-Shah BA, Kim ND, Hart WK, Pardo A, Blackwell TS, Xu Y, Chun J, Luster AD (2008) The lysophosphatidic acid receptor Lpa1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nature medicine* 14:45-54
358. Taleb S, Canello R, Poitou C, Rouault C, Sellam P, Levy P, Bouillot JL, Coussieu C, Basdevant A, Guerre-Millo M, Lacasa D, Clement K (2006) Weight loss reduces adipose tissue cathepsin s and its circulating levels in morbidly obese women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91:1042-1047
359. Tam CS, Tordjman J, Divoux A, Baur LA, Clement K (2012) Adipose tissue remodeling in children: The link between collagen deposition and age-related adipocyte growth. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97:1320-1327
360. Tan CY, Vidal-Puig A (2008) Adipose tissue expandability: The metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. *Biochemical Society transactions* 36:935-940
361. Tanaka M, Okudaira S, Kishi Y, Ohkawa R, Iseki S, Ota M, Noji S, Yatomi Y, Aoki J, Arai H (2006) Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *The Journal of biological chemistry* 281:25822-25830
362. Tang QQ, Lane MD (2012) Adipogenesis: From stem cell to adipocyte. *Annual review of biochemistry* 81:715-736
363. Tangkijvanich P, Melton AC, Chitapanarux T, Han J, Yee HF (2002) Platelet-derived growth factor-bb and lysophosphatidic acid distinctly regulate hepatic myofibroblast migration through focal adhesion kinase. *Experimental cell research* 281:140-147
364. Tania M, Khan MA, Zhang H, Li J, Song Y (2010) Autotaxin: A protein with two faces. *Biochemical and biophysical research communications* 401:493-497
365. Tchoukalova YD, Votruba SB, Tchkonina T, Giorgadze N, Kirkland JL, Jensen MD (2010) Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:18226-18231
366. Tigyi G, Parrill AL (2003) Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action. *Progress in lipid research* 42:498-526
367. Tokumura A, Fukuzawa K, Tsukatani H (1978) Effects of synthetic and natural lysophosphatidic acids on the arterial blood pressure of different animal species. *Lipids* 13:572-574
368. Tokumura A, Harada K, Fukuzawa K, Tsukatani H (1986) Involvement of lysophospholipase d in the production of lysophosphatidic acid in rat plasma. *Biochimica et biophysica acta* 875:31-38

369. Tokumura A, Kanaya Y, Miyake M, Yamano S, Irahara M, Fukuzawa K (2002) Increased production of bioactive lysophosphatidic acid by serum lysophospholipase d in human pregnancy. *Biology of reproduction* 67:1386-1392
370. Tokumura A, Majima E, Kariya Y, Tominaga K, Kogure K, Yasuda K, Fukuzawa K (2002) Identification of human plasma lysophospholipase d, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *The Journal of biological chemistry* 277:39436-39442
371. Tomsig JL, Snyder AH, Berdyshev EV, Skobeleva A, Mataya C, Natarajan V, Brindley DN, Lynch KR (2009) Lipid phosphate phosphohydrolase type 1 (lpp1) degrades extracellular lysophosphatidic acid in vivo. *The Biochemical journal* 419:611-618
372. Trayhurn P, Drevon CA, Eckel J (2011) Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle - adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk. *Archives of physiology and biochemistry* 117:47-56
373. Trayhurn P (2013) Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiological reviews* 93:1-21
374. Uchida K, Tominaga M (2011) Trpm2 modulates insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Islets* 3:209-211
375. Umemura K, Yamashita N, Yu X, Arima K, Asada T, Makifuchi T, Murayama S, Saito Y, Kanamaru K, Goto Y, Kohsaka S, Kanazawa I, Kimura H (2006) Autotaxin expression is enhanced in frontal cortex of alzheimer-type dementia patients. *Neuroscience letters* 400:97-100
376. Umezu-Goto M, Kishi Y, Taira A, Hama K, Dohmae N, Takio K, Yamori T, Mills GB, Inoue K, Aoki J, Arai H (2002) Autotaxin has lysophospholipase d activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *The Journal of cell biology* 158:227-233
377. Unal R, Yao-Borengasser A, Varma V, Rasouli N, Labbate C, Kern PA, Ranganathan G (2010) Matrix metalloproteinase-9 is increased in obese subjects and decreases in response to pioglitazone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95:2993-3001
378. Urakawa H, Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, Murashima S, Morioka K, Maruyama N, Kitagawa N, Tanaka T, Hori Y, Nakatani K, Yano Y, Adachi Y (2003) Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88:4673-4676
379. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D (2000) Coupling of stress in the er to activation of jnk protein kinases by transmembrane protein kinase ire1. *Science* 287:664-666

380. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS (1997) Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking tnfr-alpha function. *Nature* 389:610-614
381. Valet P, Pages C, Jeanneton O, Daviaud D, Barbe P, Record M, Saulnier-Blache JS, Lafontan M (1998) Alpha2-adrenergic receptor-mediated release of lysophosphatidic acid by adipocytes. A paracrine signal for preadipocyte growth. *The Journal of clinical investigation* 101:1431-1438
382. van Exel E, Gussekloo J, de Craen AJ, Frolich M, Bootsma-Van Der Wiel A, Westendorp RG, Leiden 85 Plus S (2002) Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes : The leiden 85-plus study. *Diabetes* 51:1088-1092
383. Van Hul M, Lijnen HR (2008) A functional role of gelatinase a in the development of nutritionally induced obesity in mice. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 6:1198-1206
384. Van Hul M, Lupu F, Dresselaers T, Buyse J, Lijnen HR (2012) Matrix metalloproteinase inhibition affects adipose tissue mass in obese mice. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 39:544-550
385. van Meeteren LA, Ruurs P, Christodoulou E, Goding JW, Takakusa H, Kikuchi K, Perrakis A, Nagano T, Moolenaar WH (2005) Inhibition of autotaxin by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *The Journal of biological chemistry* 280:21155-21161
386. van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, van Rooijen MA, Pradere JP, Pettit TR, Wakelam MJ, Saulnier-Blache JS, Mummery CL, Moolenaar WH, Jonkers J (2006) Autotaxin, a secreted lysophospholipase d, is essential for blood vessel formation during development. *Molecular and cellular biology* 26:5015-5022
387. van Meeteren LA, Moolenaar WH (2007) Regulation and biological activities of the autotaxin-lpa axis. *Progress in lipid research* 46:145-160
388. van Meeteren LA, Brinkmann V, Saulnier-Blache JS, Lynch KR, Moolenaar WH (2008) Anticancer activity of fty720: Phosphorylated fty720 inhibits autotaxin, a metastasis-enhancing and angiogenic lysophospholipase d. *Cancer letters* 266:203-208
389. Varma V, Yao-Borengasser A, Bodles AM, Rasouli N, Phanavanh B, Nolen GT, Kern EM, Nagarajan R, Spencer HJ, 3rd, Lee MJ, Fried SK, McGehee RE, Jr., Peterson CA, Kern PA (2008) Thrombospondin-1 is an adipokine associated with obesity, adipose inflammation, and insulin resistance. *Diabetes* 57:432-439
390. Vazzana N, Santilli F, Sestili S, Cuccurullo C, Davi G (2011) Determinants of increased cardiovascular disease in obesity and metabolic syndrome. *Current medicinal chemistry* 18:5267-5280

391. Virtue S, Vidal-Puig A (2010) Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the metabolic syndrome--an allostatic perspective. *Biochimica et biophysica acta* 1801:338-349
392. Vita AJ, Terry RB, Hubert HB, Fries JF (1998) Aging, health risks, and cumulative disability. *The New England journal of medicine* 338:1035-1041
393. Voros G, Maquoi E, Demeulemeester D, Clerx N, Collen D, Lijnen HR (2005) Modulation of angiogenesis during adipose tissue development in murine models of obesity. *Endocrinology* 146:4545-4554
394. Vucenik I, Stains JP (2012) Obesity and cancer risk: Evidence, mechanisms, and recommendations. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1271:37-43
395. Wang B, Jenkins JR, Trayhurn P (2005) Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: Integrated response to tn α . *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 288:E731-740
396. Wang JQ, Fan J, Gao JH, Zhang C, Bai SL (2013) Comparison of in vivo adipogenic capabilities of two different extracellular matrix microparticle scaffolds. *Plastic and reconstructive surgery* 131:174e-187e
397. Watanabe N, Ikeda H, Nakamura K, Ohkawa R, Kume Y, Aoki J, Hama K, Okudaira S, Tanaka M, Tomiya T, Yanase M, Tejima K, Nishikawa T, Arai M, Arai H, Omata M, Fujiwara K, Yatomi Y (2007) Both plasma lysophosphatidic acid and serum autotaxin levels are increased in chronic hepatitis c. *Journal of clinical gastroenterology* 41:616-623
398. Watanabe N, Ikeda H, Nakamura K, Ohkawa R, Kume Y, Tomiya T, Tejima K, Nishikawa T, Arai M, Yanase M, Aoki J, Arai H, Omata M, Fujiwara K, Yatomi Y (2007) Plasma lysophosphatidic acid level and serum autotaxin activity are increased in liver injury in rats in relation to its severity. *Life sciences* 81:1009-1015
399. Weidemann A, Johnson RS (2008) Biology of hif-1 α . *Cell death and differentiation* 15:621-627
400. Weir GC, Bonner-Weir S (2013) Islet beta cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1281:92-105
401. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation* 112:1796-1808

402. Wellen KE, Hotamisligil GS (2003) Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. The Journal of clinical investigation 112:1785-1788
403. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE (1999) The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. The Journal of clinical investigation 104:787-794
404. Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE (2000) Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type ii diabetes independent of insulin resistance. Diabetologia 43:1498-1506
405. Williams TM, Williams ME, Kuick R, Misek D, McDonagh K, Hanash S, Innis JW (2005) Candidate downstream regulated genes of hox group 13 transcription factors with and without monomeric DNA binding capability. Developmental biology 279:462-480
406. Willier S, Butt E, Grunewald TG (2013) Lysophosphatidic acid (lpa) signaling in cell migration and cancer invasion: A focused review and analysis of lpa receptor gene expression on the basis of more than 1700 cancer microarrays. Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization
407. Woclawek-Potocka I, Komiyama J, Saulnier-Blache JS, Brzezicka E, Bah MM, Okuda K, Skarzynski DJ (2009) Lysophosphatic acid modulates prostaglandin secretion in the bovine uterus. Reproduction 137:95-105
408. Woessner JF, Jr. (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 5:2145-2154
409. Wynn TA (2007) Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. The Journal of clinical investigation 117:524-529
410. Wynn TA (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. The Journal of pathology 214:199-210
411. Xiao Y, Junfeng H, Tianhong L, Lu W, Shulin C, Yu Z, Xiaohua L, Weixia J, Sheng Z, Yanyun G, Guo L, Min L (2006) Cathepsin k in adipocyte differentiation and its potential role in the pathogenesis of obesity. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 91:4520-4527
412. Xu KP, Yin J, Yu FS (2007) Lysophosphatidic acid promoting corneal epithelial wound healing by transactivation of epidermal growth factor receptor. Investigative ophthalmology & visual science 48:636-643
413. Xu MY, Porte J, Knox AJ, Weinreb PH, Maher TM, Violette SM, McAnulty RJ, Sheppard D, Jenkins G (2009) Lysophosphatidic acid induces alphavbeta6 integrin-mediated tgf-beta activation via

the lpa2 receptor and the small g protein g alpha(q). The American journal of pathology 174:1264-1279

414. Xu X, Yang G, Zhang H, Prestwich GD (2009) Evaluating dual activity lpa receptor pan-antagonist/autotaxin inhibitors as anti-cancer agents in vivo using engineered human tumors. Prostaglandins & other lipid mediators 89:140-146

415. Xue J, Gan L, Li X, Li J, Qi G, Wu Y, Fu X, Mao Q, Ao R, Lang J, Lu Y (2010) Effects of lysophosphatidic acid and its receptors lpa(1/3) on radiation pneumonitis. Oncology reports 24:1515-1520

416. Yamada K, Sugisaki Y, Akimoto M, Yamanaka N (1991) Short-term fk 506-induced morphological changes in rat kidneys. Transplantation proceedings 23:3130-3132

417. Yamada T, Sato K, Komachi M, Malchinkhuu E, Tobo M, Kimura T, Kuwabara A, Yanagita Y, Ikeya T, Tanahashi Y, Ogawa T, Ohwada S, Morishita Y, Ohta H, Im DS, Tamoto K, Tomura H, Okajima F (2004) Lysophosphatidic acid (lpa) in malignant ascites stimulates motility of human pancreatic cancer cells through lpa1. The Journal of biological chemistry 279:6595-6605

418. Yamashita H, Kitayama J, Shida D, Ishikawa M, Hama K, Aoki J, Arai H, Nagawa H (2006) Differential expression of lysophosphatidic acid receptor-2 in intestinal and diffuse type gastric cancer. Journal of surgical oncology 93:30-35

419. Yang M, Zhang Y, Pan J, Sun J, Liu J, Libby P, Sukhova GK, Doria A, Katunuma N, Peroni OD, Guerre-Millo M, Kahn BB, Clement K, Shi GP (2007) Cathepsin I activity controls adipogenesis and glucose tolerance. Nature cell biology 9:970-977

420. Yang M, Sun J, Zhang T, Liu J, Zhang J, Shi MA, Darakhshan F, Guerre-Millo M, Clement K, Gelb BD, Dolgiov G, Shi GP (2008) Deficiency and inhibition of cathepsin k reduce body weight gain and increase glucose metabolism in mice. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 28:2202-2208

421. Ye X, Fukushima N, Kingsbury MA, Chun J (2002) Lysophosphatidic acid in neural signaling. Neuroreport 13:2169-2175

422. Ye X, Hama K, Contos JJ, Anliker B, Inoue A, Skinner MK, Suzuki H, Amano T, Kennedy G, Arai H, Aoki J, Chun J (2005) Lpa3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. Nature 435:104-108

423. Ye X, Skinner MK, Kennedy G, Chun J (2008) Age-dependent loss of sperm production in mice via impaired lysophosphatidic acid signaling. Biology of reproduction 79:328-336

424. Yea K, Kim J, Lim S, Park HS, Park KS, Suh PG, Ryu SH (2008) Lysophosphatidic acid regulates blood glucose by stimulating myotube and adipocyte glucose uptake. *Journal of molecular medicine* 86:211-220
425. Yee Koh M, Spivak-Kroizman TR, Powis G (2008) Hif-1 regulation: Not so easy come, easy go. *Trends in biochemical sciences* 33:526-534
426. Yeo EJ, Chun YS, Cho YS, Kim J, Lee JC, Kim MS, Park JW (2003) Yc-1: A potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1. *Journal of the National Cancer Institute* 95:516-525
427. Zhang C, Baker DL, Yasuda S, Makarova N, Balazs L, Johnson LR, Marathe GK, McIntyre TM, Xu Y, Prestwich GD, Byun HS, Bittman R, Tigyi G (2004) Lysophosphatidic acid induces neointima formation through ppargamma activation. *The Journal of experimental medicine* 199:763-774
428. Zhang W, Feng D, Li Y, Iida K, McGrath B, Cavener DR (2006) Perk eif2ak3 control of pancreatic beta cell differentiation and proliferation is required for postnatal glucose homeostasis. *Cell metabolism* 4:491-497
429. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432
430. Zhao C, Sardella A, Chun J, Poubelle PE, Fernandes MJ, Bourgoin SG (2011) Tnf-alpha promotes lpa1- and lpa3-mediated recruitment of leukocytes in vivo through cxcr2 ligand chemokines. *Journal of lipid research* 52:1307-1318
431. Zhao J, He D, Su Y, Berdyshev E, Chun J, Natarajan V, Zhao Y (2011) Lysophosphatidic acid receptor 1 modulates lipopolysaccharide-induced inflammation in alveolar epithelial cells and murine lungs. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 301:L547-556
432. Zhao Y, Tong J, He D, Pendyala S, Evgeny B, Chun J, Sperling AI, Natarajan V (2009) Role of lysophosphatidic acid receptor lpa2 in the development of allergic airway inflammation in a murine model of asthma. *Respiratory research* 10:114

Résumé : L'acide lysophosphatidique (LPA) est un médiateur lipidique agissant via des récepteurs spécifiques (LPA1R) et produit par une lysophospholipase D sécrétée par différents tissus: l'autotaxine (ATX). Chez l'Homme comme chez la souris, l'expression de l'ATX dans le tissu adipeux est augmentée en situation d'obésité. Nos travaux ont mis en évidence que chez l'Homme, cette surexpression se retrouve uniquement dans les dépôts viscéraux tandis que chez la souris l'ATX est surexprimée à la fois dans les dépôts sous-cutanés et viscéraux, ce qui se traduit par une augmentation des taux de LPA plasmatiques. Nous avons également montré grâce à un modèle de souris invalidées pour le gène codant l'ATX dans l'adipocyte (F-ATX KO) que **l'augmentation de l'expression de l'ATX dans l'adipocyte est responsable de l'augmentation des taux plasmatiques de LPA en situation d'obésité.**

Nous avons ensuite mis en évidence, que sous régime obésogène, la masse adipeuse des souris F-ATX KO augmente de façon plus importante que celle des souris sauvages. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation d'un antagoniste pharmacologique des LPA1R et LPA3R, le Ki16425. L'ensemble des données obtenues par ces approches suggèrent que **l'axe ATX/LPA constitue un frein physiologique à l'expansion du tissu adipeux.**

De façon surprenante, chez les F-ATX KO comme chez les souris traitées au Ki16425, l'inhibition de l'axe ATX/LPA s'accompagne d'une amélioration de la tolérance au glucose. Le traitement au Ki16425 améliore également la tolérance à l'insuline, induit une augmentation du nombre des îlots pancréatiques et un meilleur stockage du glucose dans le muscle et le foie des animaux traités. A l'inverse, augmenter la signalisation LPA via l'injection aigue de LPA chez la souris induit une gluco-intolérance en bloquant la sécrétion d'insuline induite par le glucose, via un effet direct sur les îlots de Langerhans. Nos résultats montrent donc que **le LPA agit de manière délétère sur la prise en charge du glucose dans l'organisme.**

Dans la dernière partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la fibrose du tissu adipeux associée à l'obésité. Le LPA étant décrit comme un facteur pro-fibrosant au niveau de plusieurs autres organes, nous avons bloqué son action (Ki16425) chez des souris massivement obèses (*db/db*). Ce traitement réduit significativement la fibrose. L'effet pro-fibrosant du LPA est retrouvé au niveau d'explants de tissu adipeux humain et semble être dépendant de l'activation du facteur de transcription HIF1 α . Nos travaux suggèrent ainsi que **le LPA participe à la fibrose du tissu adipeux retrouvée en situation d'obésité.**

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse identifie le LPA comme une lipokine délétère et font donc de l'axe ATX/LPA une cible de choix pour le traitement de troubles associés à l'obésité tels que la fibrose du tissu adipeux et l'intolérance au glucose.